ZUR UMSETZUNG VON HARNSÄURE MIT 2,6-DICHLORCHINON-4-CHLORIMIN (DCI)

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
MICHAEL TEUTSCH
aus Baden-Baden

1984

ZUR UMSETZUNG VON HARNSÄURE MIT 2,6-DICHLORCHINON-4-CHLORIMIN (DCI)

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
MICHAEL TEUTSCH
aus Baden-Baden

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juli 1984

Dekan: Prof. Dr. J. Strähle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K.-A. Kovar

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.J. Roth

vorliegende Arbeit wurde im Dezember 1980 unter An-
ung von Herrn Professor Dr. K.-A. Kovar am Pharma-
schen Institut der Universität Tübingen begonnen
im April 1984 abgeschlossen.

die wertvollen Anregungen und die freundliche Unter-
zung bei der Durchführung dieser Arbeit danke ich
n Professor Dr. K.-A. Kovar sehr herzlich.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546522_0062

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	Einleitung	1
2	^{15}N-markierte Harnsäuren	6
2.1	Übersicht der Synthesen	6
2.1.1	Vorbemerkungen	6
2.1.2	Harnsäure $[1,3\text{-}^{15}N_2]$ und Harnsäure $[9\text{-}^{15}N]$	6
2.1.3	Umsetzung von 4,5-Diaminouracil mit Harnstoff $[^{15}N_2]$	8
2.1.4	Harnsäure $[7\text{-}^{15}N]$	10
2.2	Auswahl einer ^{15}N-markierten Harnsäure	12
2.2.1	Vorüberlegungen	12
2.2.2	Synthese von Harnsäure $[7\text{-}^{15}N]$	13
3	Kernresonanzspektroskopische Untersuchungen der Harnsäure $[7\text{-}^{15}N]$	15
3.1	Vorbemerkungen	15
3.2	^{13}C-NMR-Untersuchungen	15
3.2.1	^{13}C-NMR-Spektren der unmarkierten Harnsäure	15
3.2.2	^{13}C-NMR-Spektrum der Harnsäure $[7\text{-}^{15}N]$	18
3.3	^{15}N-NMR-Untersuchungen	20
4	Kernresonanzspektroskopische Untersuchungen des Farbstoffes aus Harnsäure und DCI	23
4.1	Isolierung des Farbstoffes	23
4.2	^{1}H-NMR-Spektren	25
4.3	^{1}H-NMR-Spektren einiger Vergleichsverbindungen	29
4.3.1	Vorbemerkung	29
4.3.2	DCI und 2,6-Dichlorchinon-4-oxim	30
4.3.3	2,6-Dichlorchinon-4-semicarbazon	32
4.3.4	Vergleich mit Farbstoffsalz	33

Seite

4.4 ^{13}C-NMR-Spektren 35

4.4.1 Vorbemerkung 35

4.4.2 Farbstoffsalz 35

4.4.3 Gegenüberstellung von Farbstoffsalz und Farbstoffsäure 38

4.5 ^{13}C-NMR-Spektren einiger Vergleichsverbindungen .. 39

4.5.1 Vorbemerkung 39

4.5.2 2,6-Dichlorchinon-4-chlorimin (DCI) 39

4.5.3 2,6-Dichlorchinon 41

4.5.4 2,6-Dichlor-4-aminophenol 42

4.5.5 Vergleich mit Farbstoffsalz 44

4.6 ^{13}C-NMR-Spektrum des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes 45

4.7 ^{15}N-NMR-Spektrum des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes 49

5 Untersuchungen zur Stabilität des Farbstoffes 52

5.1 Vorbemerkung 52

5.2 UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen des isolierten Farbstoffes 52

5.3 UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen unter praxisbezogenen Bedingungen 54

5.4 Untersuchung der zeitabhängigen Extinktionsabnahme bei 436 nm des Farbstoffes 57

5.5 Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Extinktion bei 436 nm im praxisbezogenen Ansatz 59

5.6 Versuche zur Verhinderung der Farbstoffzersetzung 64

Seite

6 Zusammenfassung 67

7 Experimenteller Teil 69

7.1 Geräte 69

7.2 Boratpufferlösung 71

7.3 Darstelllung von 4-Amino-5-nitrosouracil [$^{15}N{=}O$] .. 71

7.4 Darstellung von 4,5-Diaminouracil [5-$^{15}NH_2$] 72

7.5 Darstellung von Harnsäure [7-^{15}N] 74

7.6 Darstellung von 4-Amino-5-ethoxycarbonylamino-uracil 76

7.7 Synthese der Harnsäure 76

7.8 Farbstoffsäure 77

7.8.1 Darstellung nach H. Metzger 77

7.8.2 Abgeänderte Vorschrift 78

7.9 Farbstoffsalz 79

7.10 2,6-Dichlor-4-aminophenol 82

7.11 2,6-Dichlorchinon 83

7.12 2,6-Dichlorchinon-4-oxim 84

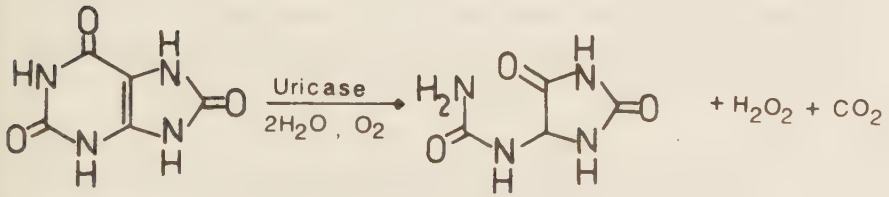
7.13 2,6-Dichlorchinon-4-semicarbazon 85

7.14 Extinktion-Zeit-Wertepaare zu den UV-Untersuchungen 86

8 Literaturverzeichnis 91

1 EINLEITUNG

Im Rahmen ihrer Arbeiten über Bestimmungsmethoden der Harnsäure im Serum entwickelte H. METZGER einen enzymatischen Farbtest[1], der eine kolorimetrische Bestimmung mit einer enzymatischen Reaktion kombinierte. Die Farbreaktion besteht dabei aus der Umsetzung von Harnsäure mit 2,6-Dichlorchinon-4-chlorimin (DCI). Diese Reaktion entdeckte FEARON[2], als er freie Phenole im Urin nach der Methode von GIBBS[3] nachweisen wollte. Die enzymatische Reaktion ist der Abbau der Harnsäure zum Allantoin durch das Enzym Uricase.



Harnsäure Allantoin

Abb.1: Abbaureaktion von Harnsäure zum Allantoin durch das Enzym Uricase

Diese Reaktion ist die Grundlage für fast alle Harnsäurebestimmungen. Entweder wird damit die Harnsäurekonzentration direkt durch Extinktionsmessung bei 293 nm ermittelt oder das bei der Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid wird über

verschiedene Hilfs- und Indikatorreaktionen quantitativ erfaßt und anschließend auf die Harnsäurekonzentration zurückgerechnet[4]. Das von H. METZGER verwendete Farbreagens DCI reagiert jedoch auch mit anderen Substanzen, die im Serum vorhanden sein können. Es entstehen farbige Produkte, welche die Harnsäurebestimmung störend beeinflussen können. Bei dieser Methode werden in der Probenlösung sowohl Harnsäure als auch die Chromogene mit DCI umgesetzt. In der Referenzlösung wird die Harnsäure durch Uricase zum Allantoin abgebaut, so daß nur die Chromogene mit DCI reagieren, denn Allantoin bildet kein Farbprodukt mit DCI. Beide Ansätze werden bei 436 nm gegeneinander vermessen. Aus der Differenz der einzelnen Extinktionen kann über eine Eichgerade die Harnsäurekonzentration ermittelt werden (Abb.2).

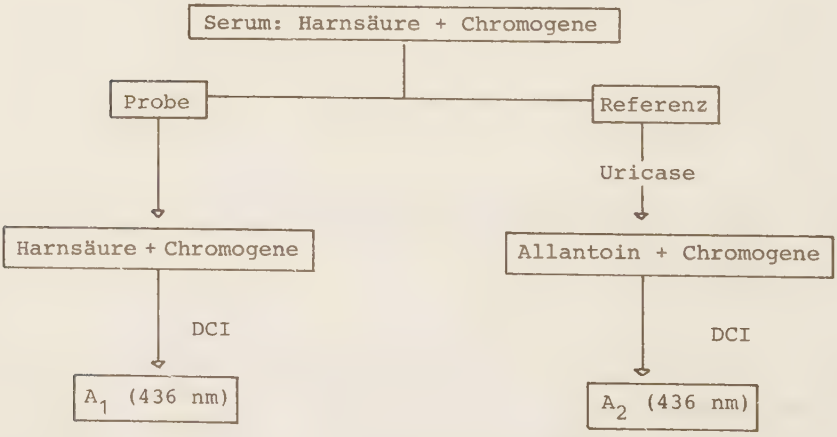
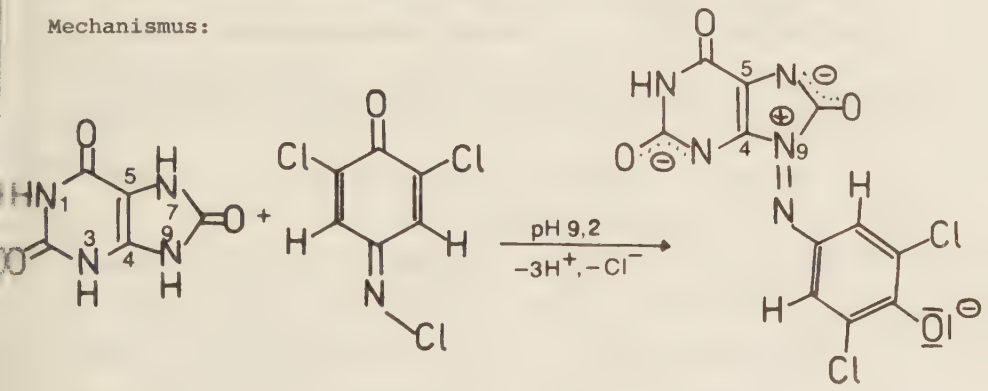


Abb.2: Schema der Harnsäurebestimmung nach H. METZGER[1]

H. METZGER gelang es außerdem, den bei der beschriebenen Bestimmung entstehenden Farbstoff zu isolieren. Aufgrund spektroskopischer Untersuchungen postulierte sie folgenden Mechanismus:



Harnsäure DCI

Abb.3: Mechanismus der Reaktion von Harnsäure mit DCI nach H. METZGER[1)]

Bei der Interpretation wurde leider wegen Lösungsschwierigkeiten kein ^{13}C-NMR-Spektrum der Harnsäure als Vergleich herangezogen. Daher mußten Hypoxanthin und Inosin -Hypoxanthin ist dort am Stickstoff N-9 mit einem Molekül D-Ribose verknüpft- als Bezugssubstanzen herangezogen werden. Im Vergleich zum Hypoxanthin ist im ^{13}C-NMR-Spektrum des Inosins das Signal des Kohlenstoffes C-4 zu höherem Feld und das von C-5 zu tieferem Feld verschoben. Da die chemischen Verschiebungen dieser beiden Kohlenstoffe im Inosin mit den entsprechenden C-Atomen der Farbstoffsäure gut übereinstimmten, vermutete H. METZGER als Angriffspunkt des DCI-Moleküls den

Stickstoff N-9 der Harnsäure. An dieser Beweisführung kamen jedoch Zweifel auf, da der DCI-Rest als elektronenziehender Substituent bei einer Kupplung am Stickstoff N-9 den Kohlenstoff C-5 zu tieferem Feld verschieben müßte.

FEARON hatte 1944 einen anderen Mechanismus vorgeschlagen:

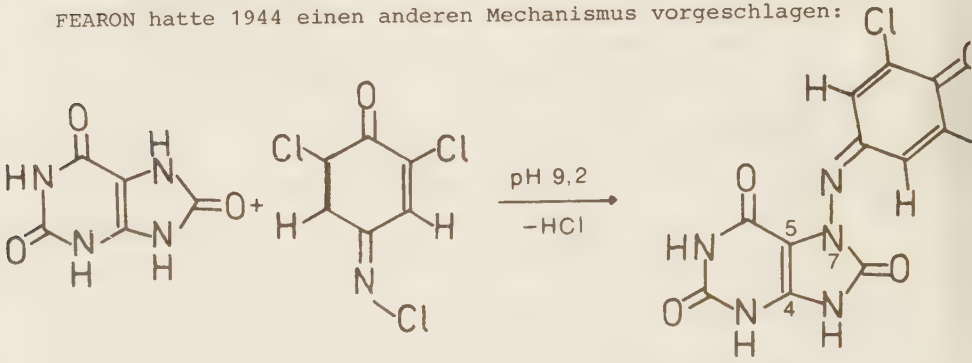


Abb.4: Mechanismus der Reaktion von Harnsäure mit DCI nach FEARON[2)]

Dieser Vorschlag konnte von FEARON experimentell nicht nachgeprüft werden, da ihm die Isolierung des Farbstoffes nicht gelang. Nach seinen Vorstellungen ist die Reaktion gebunden an ein labiles Wasserstoffatom an N-7, das in Nachbarstellung zu einer Hydroxylgruppe an C-8 steht, und an die Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffen C-4 und C-5 der Harnsäure.

Vergleicht man die beiden Vorschläge miteinander, so unterscheiden sie sich nur dadurch, welche NH-Position der Harnsäure vom elektrophilen Reagens DCI angegriffen wird. Da die Umsetzung zwischen Harnsäure und DCI im alkalischen Milieu

stattfindet, sollte die acidere NH-Position elektrophil angegriffen werden, denn sie würde als Anion vorliegen und somit die höchste Elektronendichte aufweisen. Über die Acidität der Wasserstoffatome in der Harnsäure gibt es verschiedene Untersuchungen. Während BILTZ und HERMANN[5] aus den ermittelten Dissoziationskonstanten zunächst die Reihenfolge 3-9-1-7 (abnehmende Acidität) ableiteten, wurde sie später von BILTZ zugunsten von 9-3-1-7 abgeändert[6]. Dieses Ergebnis bestätigten BERGMANN und DIKSTEIN[7] anhand von Mesomeriebetrachtungen. Zur Abklärung der wahren Verhältnisse hat PFLEIDERER[8] dieses Problem nochmals aufgegriffen und einer umfassenden Bearbeitung auf spektroskopischem Wege unterworfen. Er ermittelte wie schon BILTZ und HERMANN die Reihenfolge 3-9-1-7. Nach diesen Vorstellungen müßte DCI die Position N-3 der Harnsäure angreifen.

Die beschriebenen theoretischen Überlegungen führten zu keiner eindeutigen Aussage über den Mechanismus der Reaktion zwischen Harnsäure und DCI. Es sollten daher ^{15}N-markierte Harnsäuren sowie die entsprechenden Farbstoffe synthetisiert und ^{1}H-, ^{13}C- und ^{15}N-NMR-spektroskopisch vermessen werden, um über die Kopplungsmuster eindeutige Aussagen über den Angriff des DCI-Reagenzes zu treffen.

2 ^{15}N-MARKIERTE HARNSÄUREN

2.1 Übersicht der Synthesen

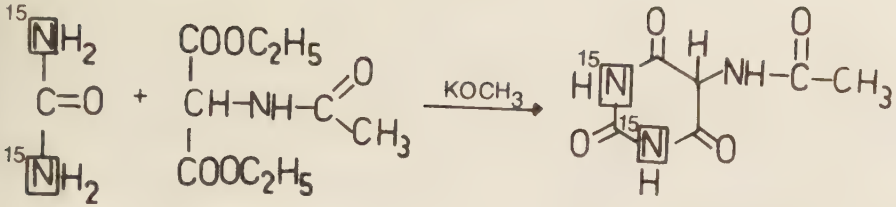
2.1.1 Vorbemerkungen

Zunächst stellte sich die Frage, welche ^{15}N-markierten Harnsäuren bekannt sind. Im Handel ist nur die Harnsäure[1,3-$^{15}N_2$] erhältlich.

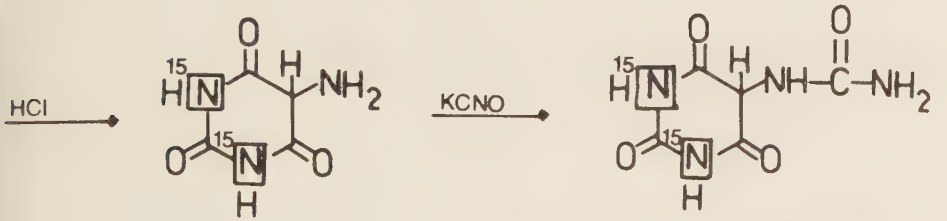
In der Literatur werden Harnsäure[1,3-$^{15}N_2$], Harnsäure[9-^{15}N] und Harnsäure[7-^{15}N] erwähnt. Letztere wird auf biologischem Wege aus Glycin[^{15}N] gewonnen[9]. Die beiden anderen ^{15}N-markierten Harnsäuren werden durch chemische Umsetzungen erhalten[10]. Nicht bekannt scheinen Harnsäure[1-^{15}N] und Harnsäure[3-^{15}N] zu sein.

2.1.2 Harnsäure[1,3-$^{15}N_2$] und Harnsäure[9-^{15}N]

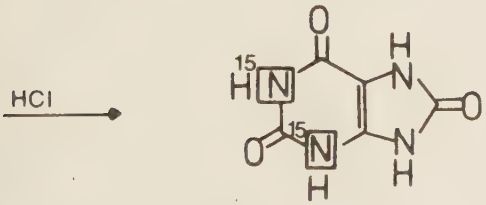
Die ersten Harnsäuresynthesen mit dem Stickstoffisotop ^{15}N versuchten CAVALIERI, BLAIR und BROWN[10]. Bei ihrer Synthese der Harnsäure[1,3-$^{15}N_2$] gingen sie von Harnstoff[$^{15}N_2$] aus, den sie mit Acetamidomalonsäurediethylester zum 7-Acetyluramil[1,3-$^{15}N_2$] unter Einwirkung von Kaliummethanolat umsetzten. Nach salzsaurer Hydrolyse erhielten sie Uramil[1,3-$^{15}N_2$]. Anschließend wurde diese Verbindung mit Kaliumcyanat zur Pseudoharnsäure[1,3-$^{15}N_2$] umgesetzt. Daraus wurde durch Behandeln mit Salzsäure Harnsäure[1,3-$^{15}N_2$] hergestellt (Abb.5).



Harnstoff $\left[{}^{15}N_2\right]$ Acetamidomalonsäurediethylester 7-Acetyluramil $\left[1,3\text{-}{}^{15}N_2\right]$



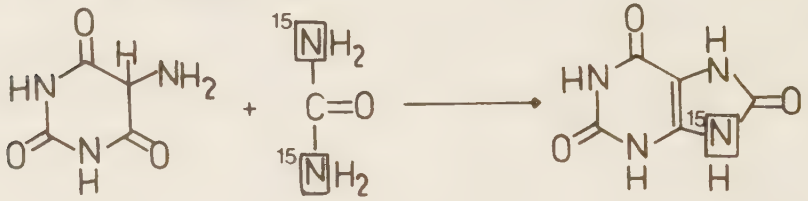
Uramil $\left[1,3\text{-}{}^{15}N_2\right]$ Pseudoharnsäure $\left[1,3\text{-}{}^{15}N_2\right]$



Harnsäure $\left[1,3\text{-}{}^{15}N_2\right]$

Abb.5: Synthese der Harnsäure $\left[1,3\text{-}{}^{15}N_2\right]$ nach CAVALIERI, BLAIR und BROWN[10)]

In einer weiteren Synthese gelang es ihnen, durch Umsetzung von Uramil mit Harnstoff[$^{15}N_2$] die Harnsäure[9-^{15}N] darzustellen (Abb.6).

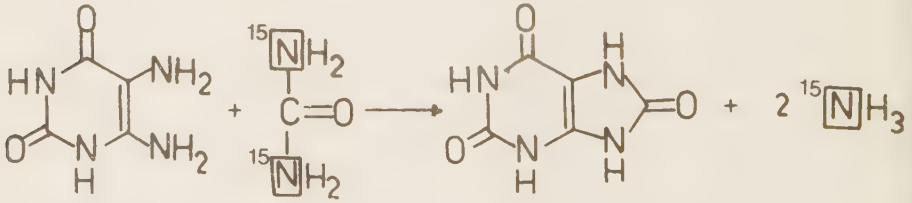


Uramil Harnstoff[$^{15}N_2$] Harnsäure[9-^{15}N]

Abb.6: Synthese der Harnsäure[9-^{15}N] nach CAVALIERI, BLAIR und BROWN[10)]

2.1.3 Umsetzung von 4,5-Diaminouracil mit Harnstoff[$^{15}N_2$]

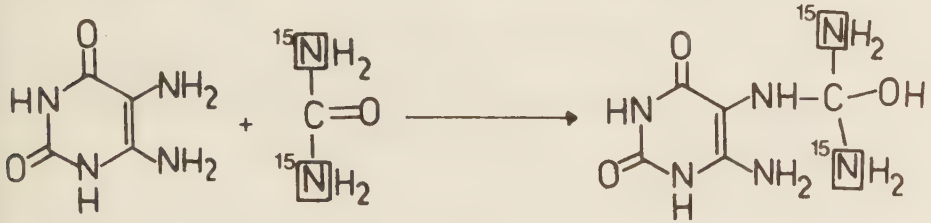
CAVALIERI gelang nicht, durch Kondensation von 4,5-Diaminouracil und Harnstoff[$^{15}N_2$] gleichzeitig die Positionen N-7 und N-9 der Harnsäure mit ^{15}N zu markieren (Abb.7).



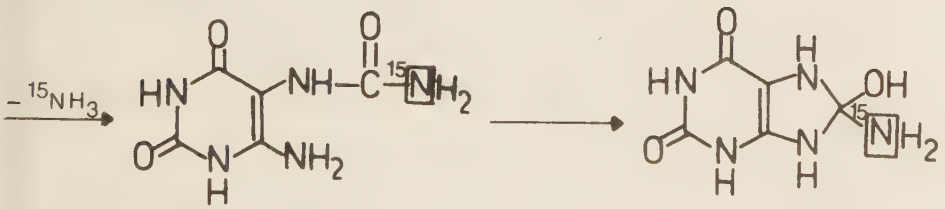
4,5-Diaminouracil Harnsäure

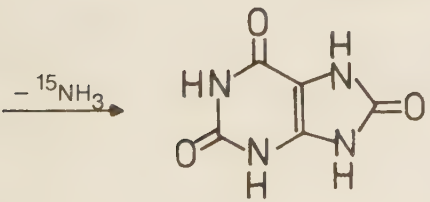
Abb.7: Reaktion von 4,5-Diaminouracil mit Harnstoff[$^{15}N_2$] nach CAVALIERI, BLAIR und BROWN[10)]

Wie später auch CLUSIUS und VECCHI[11] zeigen konnten, stammt der bei dieser Reaktion abgespaltene Ammoniak aus dem eingesetzten Harnstoff, während die beiden Aminogruppen des 4,5-Diaminouracils quantitativ in den Imidazolring der Harnsäure eingebaut werden. CLUSIUS und VECCHI schlugen deshalb für diese Reaktion den folgenden Mechanismus vor:



4,5-Diaminouracil Harnstoff$\left[{}^{15}N_2\right]$





Harnsäure

Abb.8: Mechanismus der Reaktion zwischen 4,5-Diaminouracil und Harnstoff$\left[{}^{15}N_2\right]$ nach CLUSIUS und VECCHI[11]

2.1.4 Harnsäure [7-^{15}N]

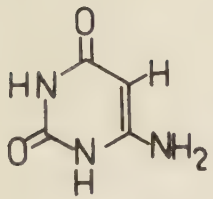
Ausgehend von diesem Mechanismus muß für die Synthese der Harnsäure [7-^{15}N] ein anderer Weg gewählt werden. Da sich durch Umsetzung von 4,5-Diaminouracil mit Harnstoff [$^{15}N_2$] die Positionen N-7 und N-9 nicht mit ^{15}N markieren lassen, sollte man dieses Ziel über die Reaktion von 4,5-Diaminouracil [4,5-($^{15}NH_2$)$_2$] mit Harnstoff erreichen können. Die Harnsäure [7-^{15}N] sollte sich in Anlehnung an diese Überlegungen aus 4,5-Diaminouracil [5-$^{15}NH_2$] und Harnstoff synthetisieren lassen.

Nach TRAUBE[12] ist 4,5-Diaminouracil durch Nitrosierung von 4-Aminouracil und anschließender Reduktion der Nitrosogruppe zur Aminogruppe zugänglich. Setzt man bei der Nitrosierung ^{15}N-markiertes Natriumnitrit ein, so kann das gewünschte 4-Amino-5-nitrosouracil [5-^{15}N=O] erhalten werden.

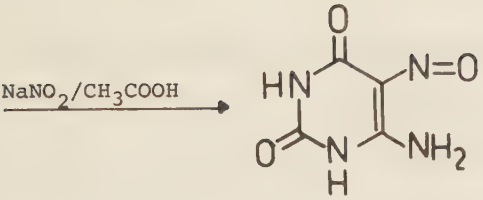
Von 4,5-Diaminouracil ausgehend läßt sich Harnsäure auf zwei verschiedenen Wegen darstellen:

- nach JOHNSON und JOHNS[13] durch Reaktion mit Harnstoff
- nach TRAUBE[14] durch Umsetzung mit Chlorameisensäureethylester und anschließendem Ringschluß.

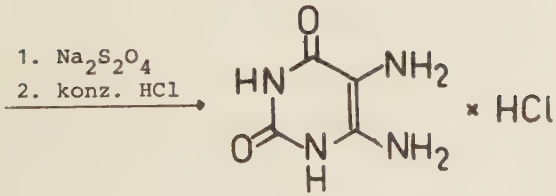
Theoretisch sind beide Synthesewege geeignet, aus 4,5-Diaminouracil [5-$^{15}NH_2$] Harnsäure [7-^{15}N] herzustellen (Abb.9).



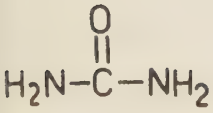
4-Aminouracil

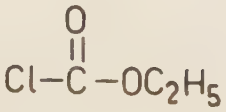


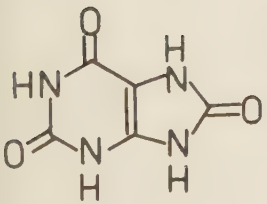
4-Amino-5-nitrosouracil

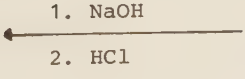


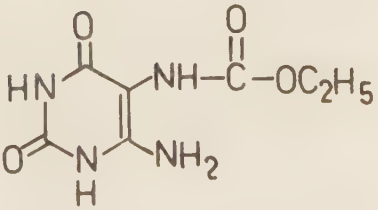
4,5-Diaminouracil-hydrochlorid











Harnsäure

4-Amino-5-ethoxycarbonyl-aminouracil

Weg 1

Weg 2

Abb.9: Synthese von Harnsäure, ausgehend von 4-Aminouracil

2.2 Auswahl einer ^{15}N-markierten Harnsäure

2.2.1 Vorüberlegungen

Von den beschriebenen ^{15}N-markierten Harnsäuren kommen zur Lösung des Problems vor allem solche Harnsäuren in Frage, die nur ein Stickstoffisotop ^{15}N im Molekül aufweisen. Dies sind Harnsäure$\left[7\text{-}^{15}N\right]$ und Harnsäure$\left[9\text{-}^{15}N\right]$. Wie schon beschrieben, griff H. METZGER[1] die Vorstellung von BILTZ[6] auf und nahm an, daß der Wasserstoff an N-9 am acidesten sei und daher mit DCl reagiere. Nach Untersuchungen von PFLEIDERER[8] besitzt aber das Proton an N-3 die größte Acidität, so daß eine Kupplung an N-9 unwahrscheinlich schien. Dies könnte durch Umsetzung von Harnsäure$\left[3\text{-}^{15}N\right]$ mit DCl nachgeprüft werden. Die Synthese der Harnsäure$\left[3\text{-}^{15}N\right]$ ist jedoch äußerst kompliziert. Der Pyrimidin-Ring wird normalerweise aus Harnstoff und Cyanessigsäureethylester aufgebaut. Bei Verwendung von Harnstoff$\left[^{15}N_2\right]$ werden beide Stickstoffe im Pyrimidin-Ring mit ^{15}N markiert, während bei Einsatz von Harnstoff$\left[^{15}N\right]$ ein Gemisch aus 4-Aminouracil$\left[1\text{-}^{15}N\right]$ und 4-Aminouracil$\left[3\text{-}^{15}N\right]$ entstehen würde, dessen Trennung nicht gelingen kann. Mittlerweile gelang die Aufnahme eines ^{13}C-NMR-Spektrums der Harnsäure (siehe 3.2). Der Vergleich mit dem Farbstoffsäurespektrum von H. METZGER[1] zeigte, daß die Kohlenstoffe C-4 und C-5 der Harnsäure durch die Kupplung mit DCl zu tieferem Feld verschoben werden, wobei C-5 eine signifikant stärkere Tieffeldverschiebung als C-4 aufweist. Bei einem Angriff von DCl an den Stickstoffatomen N-3 oder N-9

sollte der gegenteilige Effekt auftreten. Es lag daher nahe, FEARONS Vorschlag[2] aufzugreifen, der eine Reaktion am Stickstoff N-7 vorsah. Dies sollte durch Umsetzung von Harnsäure[7-^{15}N] mit DCI überprüft werden.

2.2.2 Synthese von Harnsäure[7-^{15}N]

Für die Synthese von Harnsäure[7-^{15}N] erschienen die beiden Wege in Abb.9 als geeignet.

Die Darstellung von 4-Amino-5-nitrosouracil[5-^{15}N=O] erfolgte analog einer Vorschrift aus Organic Synthesis[15]. Die angegebene Vorschrift mußte abgeändert werden. Da dort mit unmarkiertem Material gearbeitet wurde, mußten die angegebenen Mengenverhältnisse so verändert werden, daß die Ausbeute kaum verringert wurde, aber mit möglichst wenig ^{15}N-markiertem Natriumnitrit gearbeitet werden konnte. Die Menge an eingesetztem Na^{15}NO$_2$ mußte einerseits zur vollständigen Nitrosierung ausreichen, auf der anderen Seite mußte mit dem teuren Material sparsam umgegangen werden. Als weitere Schwierigkeit erwies sich die Tatsache, daß die Nitrosierung des 4-Aminouracils in einer Suspension mit Wasser/Eisessig durchgeführt werden mußte. Die in der Vorschrift angegebenen Mengen[15] an Lösungsmittel wurden zu diesem Zweck erhöht, um eine gut rührbare Mischung zu erhalten. Die angegebene Reaktionszeit nach der Zugabe des Nitrits wurde ebenfalls verlängert.

Das dabei erhaltene 4-Amino-5-nitrosouracil[5-^{15}N=O] wurde anschließend ohne weitere Reinigung mit Natriumdithionit reduziert und die so gewonnene Diaminoverbindung sofort in das

Hydrochlorid umgewandelt. Nach Abb.9 kann das 4,5-Diaminouracilhydrochlorid [5-$^{15}NH_2$] auf zwei verschiedenen Wegen zur Harnsäure [7-^{15}N] umgesetzt werden. Nach der praktischen Erprobung beider Varianten mit unmarkiertem Material fiel die Wahl auf die Reaktion mit Harnstoff. Sie lieferte höhere Ausbeuten und war im Gegensatz zur Synthese mit Chlorameisensäureethylester eine einstufige Reaktion. Die besten Ausbeuten wurden dabei durch Umsetzung mit der gleichen Gewichtsmenge Harnstoff (vgl. JOHNSON und JOHNS[13]) erreicht. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte über das Natriumsalz, die Identifizierung mit Hilfe des IR-Spektrums (vgl.[1]).

3 KERNRESONANZSPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN DER HARNSÄURE [7-^{15}N]

3.1 Vorbemerkungen

Für NMR-spektroskopische Untersuchungen der Harnsäure [7-^{15}N] kommen nur ^{13}C- und ^{15}N-NMR-Spektren in Betracht. ^{1}H-NMR-Spektren lassen sich nicht auswerten, da alle vier NH-Protonen als ein breites Signal absorbieren.

Ein großes Problem bei der Aufnahme der Spektren war die schlechte Löslichkeit der Harnsäure, an der schon H. METZGER gescheitert war. Die geringe Empfindlichkeit der ^{13}C- und ^{15}N-Kerne kommt erschwerend hinzu[16]. Sie ist auf das geringe natürliche Vorkommen und das kleine magnetische Moment dieser Kerne zurückzuführen. Diesen Schwierigkeiten kann mit folgenden Methoden begegnet werden:

- große Anzahl an akkumulierten Einzelmessungen
- Verwendung von ^{12}C-angereicherten Lösungsmitteln
- höhere Magnetfeldstärken.

Bei der Aufnahme der vorliegenden Spektren wurden im allgemeinen diese Techniken kombiniert.

3.2 ^{13}C-NMR-Untersuchungen

3.2.1 ^{13}C-NMR-Spektren der unmarkierten Harnsäure

Die ^{13}C-NMR-Spektren der unmarkierten Harnsäure stellen die Grundlage zur Interpretation der entsprechenden Spektren der Harnsäure [7-^{15}N] dar. Das protonenentkoppelte Spektrum (Abb.10) zeigt erwartungsgemäß fünf Signale.

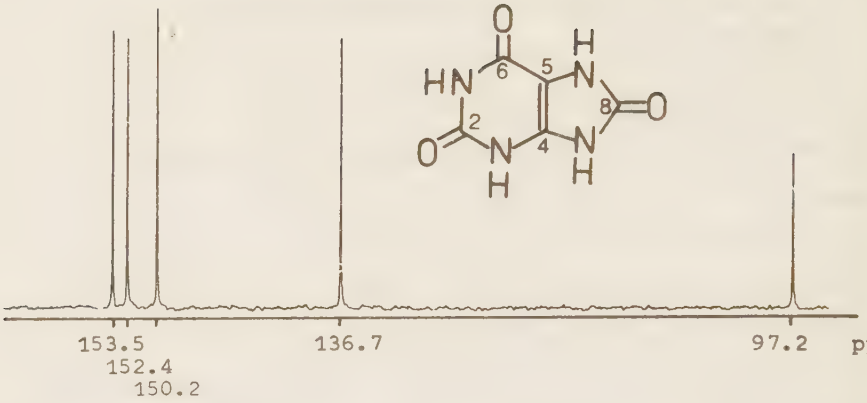


Abb.10: 20,115 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum der Harnsäure in ^{12}C-DMSO-d_6, protonenbreitbandentkoppelt

Das Kohlenstoffatom C-5 absorbiert bei 97.2 ppm, es spaltet im gekoppelten Spektrum (Abb.11) in ein Multiplett auf infolge dreier $^3J_{CH}$-Kopplungen mit den Protonen der Stickstoffe N-1, N-3 und N-9. Der andere olefinische Kohlenstoff C-4 tritt bei 136.7 ppm in Resonanz, im gekoppelten Spektrum erscheint er wegen der $^3J_{CH}$-Kopplung mit dem Proton am Stickstoff N-7 als Dublett. Die drei Carbonylkohlenstoffe C-2, C-6 und C-8 zeigen drei Singuletts bei 150.2 ppm, 152.4 ppm und 153.5 ppm im entkoppelten Spektrum. Das Signal bei 152.4 ppm zeigt eine leichte Anspaltung im gekoppelten Spektrum, die auf eine $^3J_{CH}$-Kopplung hindeuten könnte.
Demzufolge kann es dem Kohlenstoff C-6 zugeordnet werden, der eine solche Kopplung zum Proton am Stickstoff N-7 aufweist. Die beiden anderen Resonanzen lassen sich mit Hilfe dieser Spektren nicht eindeutig interpretieren. Die Zuordnungen der Kohlenstoffe C-2 und C-8 sind also austauschbar (Tab.1).

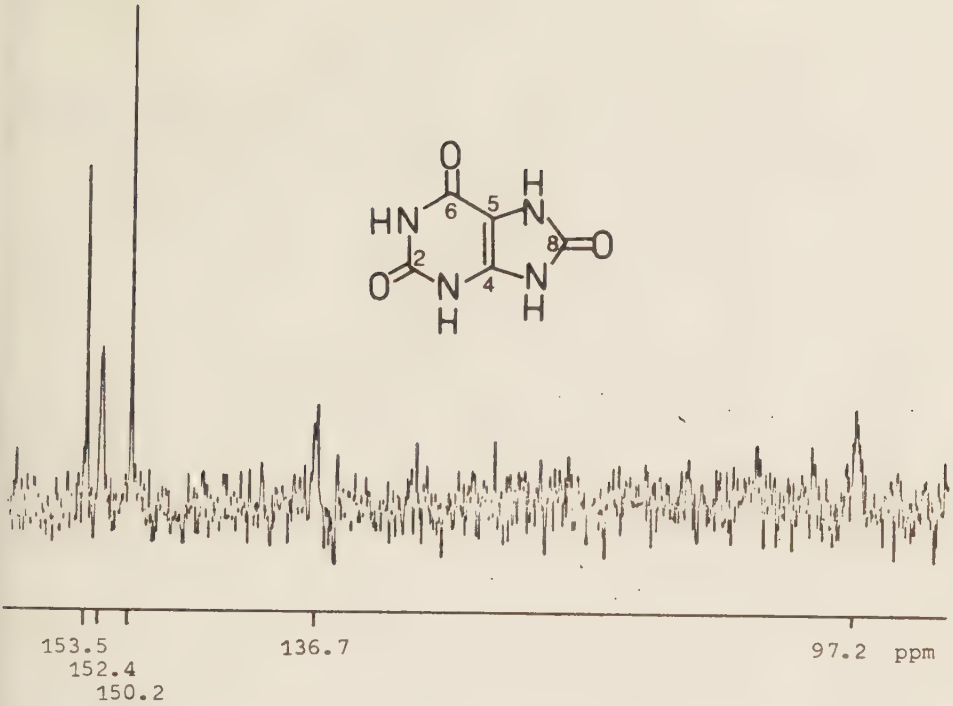


Abb.11: 20,115 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum der Harnsäure in DMSO-d_6, gekoppelt

Tab.1: Zuordnung der ^{13}C-Resonanzen der Harnsäure in DMSO-d_6

Kohlenstoff	ppm	Multiplizität	$^3J_{CH}$-Kopplungspartner
C-2*	150.2	s	-
C-8*	153.5	s	-
C-6	152.4	d	H-7
C-4	136.7	d	H-7
C-5	97.2	m	H-1, H-3, H-9

* Zuordnung austauschbar

3.2.2 ^{13}C-NMR-Spektrum der Harnsäure[7-^{15}N]

Das protonenbreitbandentkoppelte Spektrum der Harnsäure[7-^{15}N] (Abb.12) weist ebenfalls fünf Signale auf.

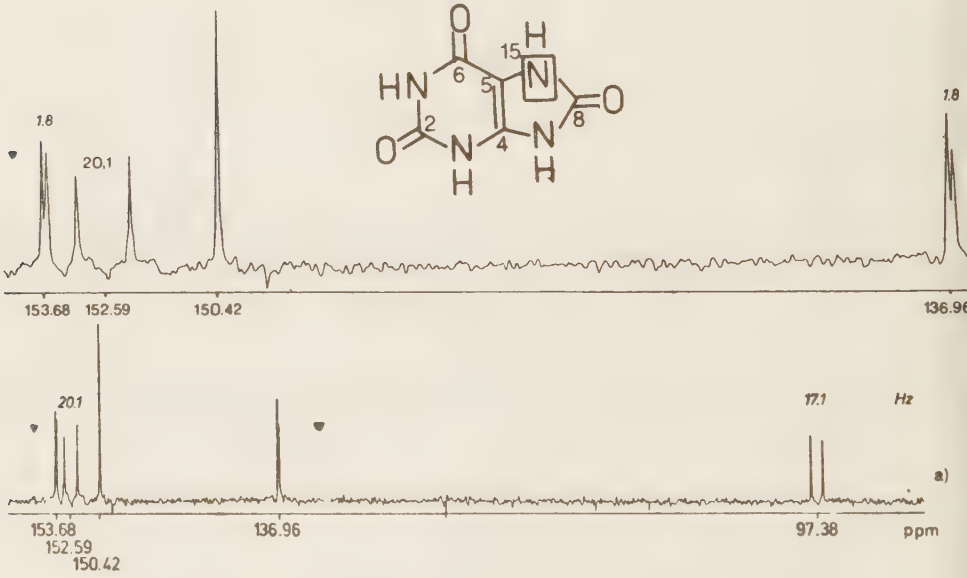


Abb.12: a) 100 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum der Harnsäure[7-^{15}N] in DMSO-d_6, breitbandentkoppelt
b) gespreiztes Teilspektrum

Vier Resonanzen sind dabei in Dubletts aufgespalten, während ein Signal als Singulett erscheint. Zwei der Dubletts zeigen relativ große Kopplungskonstanten von 17,1 Hz und 20,1 Hz, die beiden anderen weisen Kopplungskonstanten von 1,8 Hz auf. Die Zuordnung kann wie folgt getroffen werden:

Das Signal bei 150.42 ppm erscheint im Spektrum der Harnsäure [7-^{15}N] als Singulett und gehört damit zum Kohlenstoff C-2, denn eine Kopplung mit dem ^{15}N-markierten Stickstoff N-7 über vier Bindungen wäre zwar möglich, wird aber im Spektrum nicht aufgelöst. Die Resonanzen bei 97.38 ppm und 152.59 ppm gehören zu C-Atomen, die in Nachbarstellung zum Stickstoff ^{15}N-7 stehen, also den Kohlenstoffen C-5 und C-8, da sie große Kopplungskonstanten von 17,1 Hz und 20,1 Hz zeigen. Schon der deutliche Unterschied der chemischen Verschiebungen zeigt, daß das Signal bei 97.38 ppm -es liegt im Bereich der olefinischen Kohlenstoffe- zum C-Atom C-5 gehört, während das Signal bei 152.59 ppm zum Carbonylkohlenstoff C-8 paßt. Untermauert wird diese Vorstellung durch den Betrag der Kopplungskonstanten von 20,1 Hz für das Signal bei 152.59 ppm, wenn man als Vergleich die entsprechende Kopplungskonstante im Harnstoff von 20,2 Hz heranzieht[17]. Die Zuordnung der Resonanzen für die Kohlenstoffe C-4 und C-6 läßt sich wieder durch den Unterschied der chemischen Verschiebungen treffen. Das Signal bei 136.96 ppm liegt noch im Bereich der olefinischen C-Atome, gehört also zum Kohlenstoff C-4. Für den Carbonylkohlenstoff C-6 bleibt nur das Signal bei 153.68 ppm. Beide Signale zeigen eine kleine Kopplungskonstante von 1,8 Hz. Dieser Betrag entspricht einer Kopplung über zwei Bindungen[18].

Tab.2: Zuordnung der ^{13}C-Resonanzen der Harnsäure[7-^{15}N] in DMSO-d_6

Kohlenstoff	ppm	Multiplizität	Kopplungkonstante $^{n}J_{CN}$
C-2	150.42	s	--
C-4	136.96	d	1,8 Hz (^{2}J)
C-5	97.38	d	17,1 Hz (^{1}J)
C-6	153.68	d	1,8 Hz (^{2}J)
C-8	152.59	d	20,1 Hz (^{1}J)

Ein Vergleich der in Tab.1 und Tab.2 aufgeführten Daten zeigt, daß die ursprünglich getroffene Zuordnung der drei Carbonylkohlenstoffe revidiert werden muß. Mit Hilfe der ^{13}C-^{15}N-Kopplungen gelingt eine eindeutige Zuordnung dieser Signale.

3.3 ^{15}N-NMR-Untersuchungen

Die vorliegenden ^{15}N-NMR-Spektren (Abb.13) wurden in einer gesättigten Lösung in DMSO-d_6 aufgenommen. Direkter Standard war Nitromethan mit der chemischen Verschiebung von 380 ppm gegen den jetzt empfohlenen Standard Ammoniak (0,0 ppm).

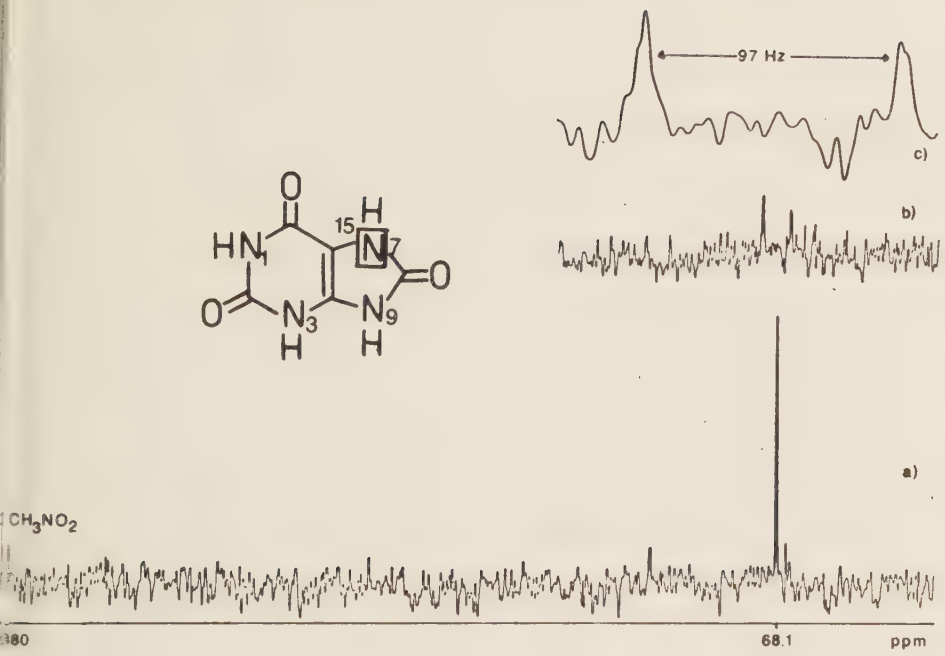


Abb.13: 9,12 MHz-^{15}N-NMR-Spektrum der Harnsäure [7-^{15}N]
in DMSO-d_6, ppm-Werte bezogen auf Ammoniak (0.0 ppm)
a) protonenbreitbandentkoppelt
b) gekoppelt
c) gespreiztes Spektrum von b)

Die chemische Verschiebung des Stickstoffes ^{15}N-7 der Harnsäure [7-^{15}N] beträgt 68.1 ppm, bezogen auf Ammoniak (0.0 ppm). Im gekoppelten Spektrum spaltet das Signal in ein Dublett auf, die Kopplungskonstante beträgt 97,0 Hz. Die anderen Stickstoffatome zeigen hier erwartungsgemäß wegen der zu geringen natürlichen Häufigkeit an Stickstoffisotop ^{15}N gegenüber dem mit ^{15}N angereicherten Stickstoff N-7 keine Signale. Durch den negativen Kern-Overhauser-Effekt des Stickstoffes müßte das ^{15}N-7-Signal eigentlich nach "unten" zeigen, wegen der Unterdrückung dieses Effektes zeigt es jedoch nach "oben".
Die beobachtete chemische Verschiebung von 68.1 ppm paßt zu einem Harnstoff-Stickstoff, dessen Verschiebung laut LEVY und LICHTER[19] zwischen 60 und 120 ppm (bezogen auf Ammoniak) liegt. Die ^{15}N-^{1}H-Kopplungskonstante von 97,0 Hz liegt ebenfalls im erwarteten Bereich für Kopplungskonstanten mit Protonen, die über eine trigonale Bindung am Stickstoff gebunden sind[20]. WITANOWSKI, STEFANIAK und WEBB[21] geben einige Beispiele für ^{15}N-^{1}H-Kopplungskonstanten in Harnstoffderivaten an:

Harnstoff:	88,5 Hz (DMSO)
Diphenylharnstoff:	87,9 Hz (DMSO)
Dimethylharnstoff:	88,7 Hz
Imidazolin-2-on:	92,2 Hz.

4 KERNRESONANZSPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DES FARBSTOFFES AUS HARNSÄURE UND DCI

4.1 Isolierung des Farbstoffes

FEARONS Versuche, den bei der Reaktion von Harnsäure mit DCI entstehenden Farbstoff zu isolieren, blieben erfolglos[2]. Dies gelang H. METZGER[1] auf folgende Weise: Eine konzentrierte Harnsäurelösung unter Zusatz von Lithiumcarbonat wurde mit 0,1 M-Boratpuffer (pH 9,2) versetzt und nach dem Filtrieren sofort in eine auf -4°C abgekühlte Lösung von DCI in absolut. Ethanol gegossen. Der ausgefallene Farbstoff wurde als N-9-(2',6'-Dichlorchinon-4'-imino)-dinatriumurat bezeichnet. Anschließend wurde dieses Farbstoffsalz in die N-9-(2',6'-Dichlorchinon-4'-imino)-harnsäure umgewandelt.

Die ersten Versuche nach der Vorschrift von H. METZGER den Farbstoff zu isolieren, mißlangen. Der Farbstoff fiel dabei wider Erwarten nicht aus und mußte deshalb durch längeres Kühlen im Eisfach ausgefällt werden. Diese Methode hatte aber den Nachteil, daß sich der Farbstoff dabei zu zersetzen begann. Das Eingießen der Harnsäurelösung in die DCI-Lösung wurde dann unter Kühlung mit einer Eis-Kochsalz-Mischung durchgeführt. Dieses Verfahren führte zu einem voluminösen roten Niederschlag, der sich beim Trocknen violett färbte. Das so isolierte Farbstoffsalz wurde nach der Vorschrift von H. METZGER in die Farbstoffsäure umgewandelt. Die gelbe Farbstoffsäure wurde anschließend aus Aceton unter Zusatz einiger Tropfen DMSO umkristallisiert. Die UV- und IR-Spektren zeigten Übereinstimmung mit den Messungen von H. METZGER.

Neben der Darstellung der Farbstoffsäure wurde auch versucht, das Farbstoffsalz möglichst rein zu isolieren. Dazu war es wichtig, die Mitfällung von eventuell auftretenden Neben- und Zersetzungsprodukten zu vermeiden. Vorversuche hatten ergeben, daß sich das Farbstoffsalz nicht aus der wäßrigen Reaktionslösung mit den üblichen Lösungsmitteln wie Diethylether oder Chloroform extrahieren läßt. Beim Ausschütteln einer Mischung aus 0,1 M-Boratpuffer (pH 9,2), wäßriger Lithiumcarbonatlösung und ethanolischer DCI-Lösung erkennt man an der Braunfärbung der organischen Phase, daß sich das Reagens in diesem Milieu zersetzt. Da Zersetzungsprodukte auch bei der Reaktion zwischen Harnsäure und DCI auftreten könnten, sollte ihre Entfernung entweder durch sofortiges Ausschütteln des Reaktionsansatzes mit Ether oder durch Digerieren des ausgefällten Farbstoffsalzes mit Ether möglich sein. Zur Darstellung eines möglichst reinen Farbstoffsalzes wurde der ersten Variante der Vorzug gegeben. Dadurch erhielt man ein Reaktionsgemisch, das sich wesentlich langsamer zersetzte und aus dem das Farbstoffsalz auch durch langsames Ausfällen in der Kälte isoliert werden konnte. Nach dieser Methode wurden ein unmarkiertes und ein ^{15}N-markiertes Farbstoffsalz hergestellt. Auf dem gleichen Weg wurden auch die entsprechenden Farbstoffsäuren dargestellt.

4.2 ^{1}H-NMR-Spektren

Das Spektrum des unmarkierten Farbstoffsalzes (Abb.14) zeigt ein Singulett bei 7.8 ppm für die beiden Protonen des Chinonimin-Teils.

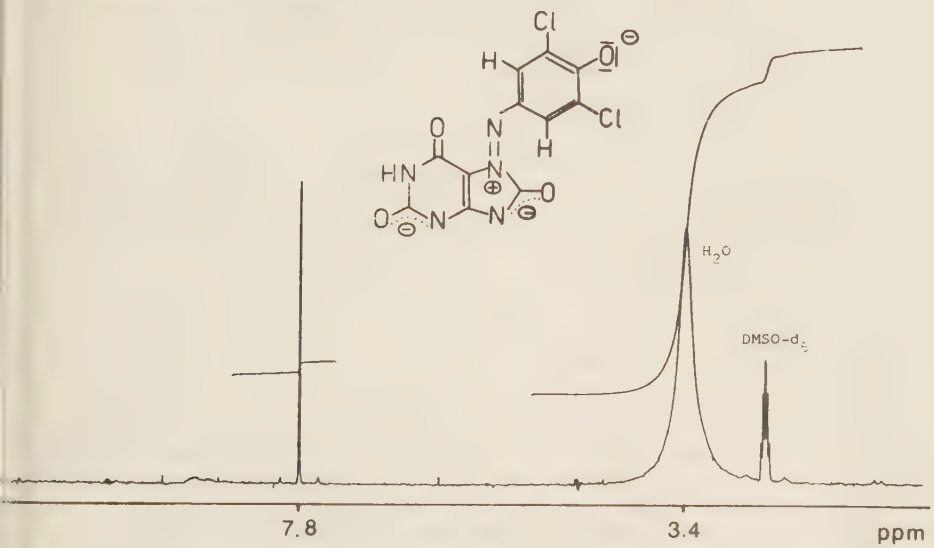


Abb.14: 80 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des Farbstoffsalzes in DMSO-d_6

Im entsprechenden Spektrum der unmarkierten Farbstoffsäure absorbieren diese Protonen bei 8.14 ppm ebenfalls als Singulett. Sie sind im Gegensatz zu den gleichen Protonen im DCI-Reagens (siehe 4.3) äquivalent. Die Protonen des Harnsäure-Teils der Farbstoffmolekel geben vermutlich infolge von Austauschprozessen kein Signal.

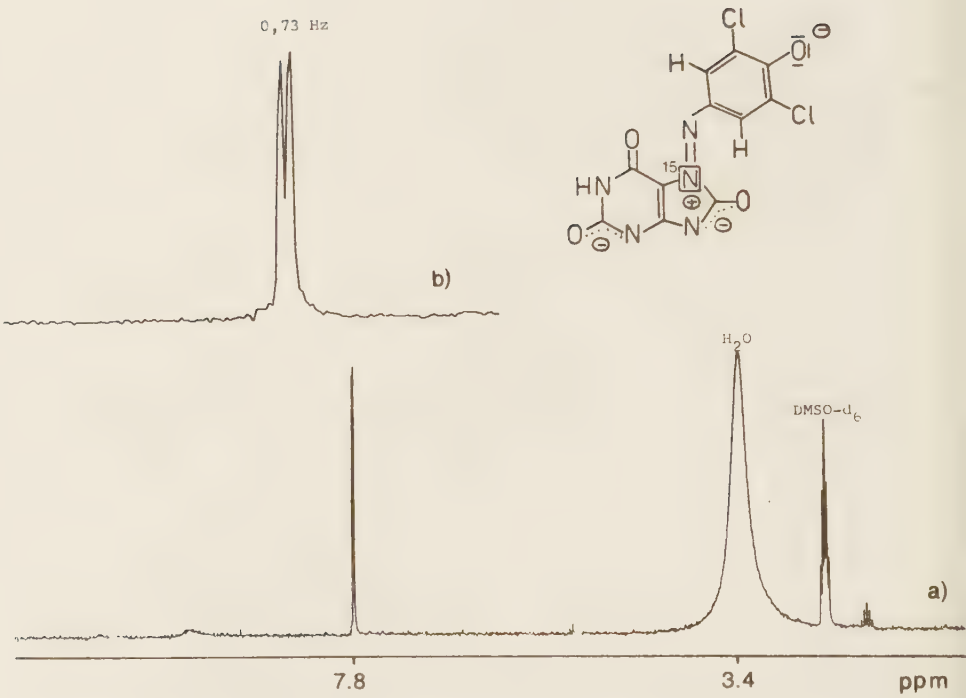


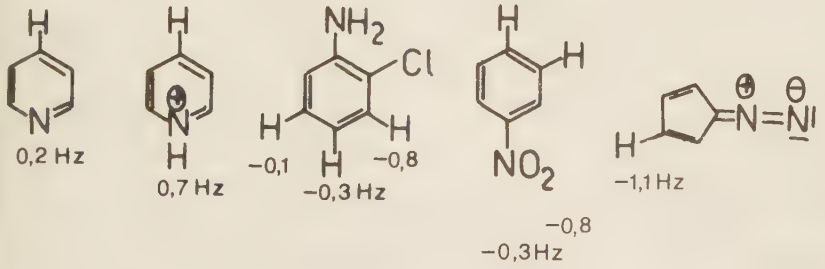
Abb.15: a) 80 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes in DMSO-d_6

b) gespreiztes Signal bei 7.8 ppm

Im gespreizten Spektrum des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes (Abb.15) erkennt man eine geringe Anspaltung von 0,73 Hz des Signals bei 7.8 ppm. Da sie im Spektrum des unmarkierten Farbstoffsalzes nicht auftritt, kann sie nur von einer Kopplung der Chinoniminring-Protonen mit dem Stickstoff ^{15}N-7 des Harnsäureteils herrühren. Dieser Betrag deutet auf eine ^{15}N-^{1}H-Kopplung über mehr als drei Bindungen hin. Nach LEVY und LICHTER bedürfen solche Kopplungen eines mesomeren Systems,

um aufgelöst werden zu können[22]. Systematische Studien darüber liegen noch nicht vor, es existieren jedoch eine Reihe von Beispielen (Tab.3).

Tab.3: Einige Beispiele für ^{15}N-^{1}H-Kopplungen über mehr als drei Bindungen[22),23)]



in substituierten Anilinen:	0,3 bis 0,9 Hz
Heterocyclen:	0,1 bis 1,1 Hz
Nitroverbindungen:	0,4 bis 0,95 Hz

Betrachtet man die Strukturvorschläge von FEARON und H. METZGER unter diesen Gesichtspunkten, so läßt sich folgendes feststellen: In der von H. Metzger vorgeschlagenen Struktur ist der Stickstoff ^{15}N-7 sechs Bindungen von den Chinoniminring-Protonen entfernt, so daß eine Kopplung zwischen ihnen nicht möglich zu sein scheint. Außerdem wären die beiden Kopplungspartner nicht in ein mesomeres System eingebunden. In FEARONS Vorschlag beträgt die fragliche Entfernung nur vier Bindungen,

damit wäre eine auflösbare Kopplung möglich, wie die Beispiele in Tab.3 zeigen. Außerdem sind beide Kopplungspartner Bestandteile eines mesomeren Systems, das sich zwischen dem Stickstoff ^{15}N-7 und dem Carbonylsauerstoff des Chinoniminringes formulieren läßt (Abb.16).

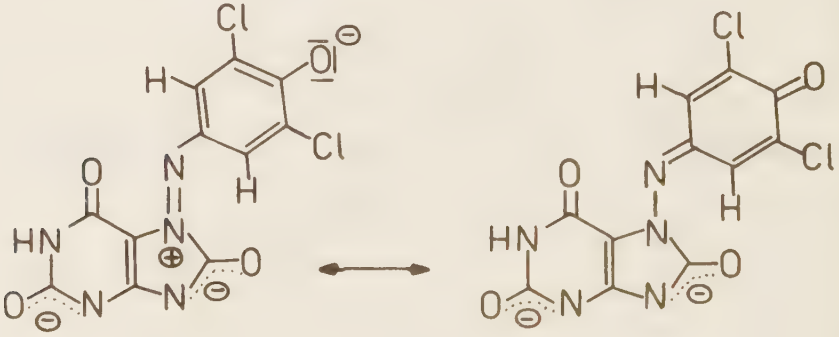


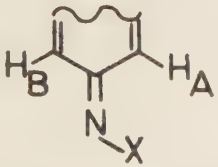
Abb.16: Mesomere Grenzformeln des Strukturvorschlages für das Farbstoffsalz nach FEARON[2)]

Das Auftreten einer Kopplung zwischen dem Stickstoff ^{15}N-7 und den beiden Chinoniminring-Protonen spricht also für den von FEARON postulierten Mechanismus.

4.3 ^{1}H-NMR-Spektren einiger Vergleichsverbindungen

4.3.1 Vorbemerkung

Wie bereits beschrieben, sind die beiden Chinoniminringprotonen im Farbstoffmolekül chemisch äquivalent. Diese Tatsache überrascht, denn bei Vorliegen der Chinonimin-Teilstruktur



sollte man für die beiden Protonen H_A und H_B unterschiedliche chemische Verschiebungen erwarten, da das Proton H_A in räumlicher Nähe zum Substituent X steht, während H_B mit dem Rest X nicht in Wechselwirkung treten kann. Eine Nichtäquivalenz dieser Protonen kann als Folge der behinderten freien Drehbarkeit um die C=N-Achse angesehen werden. Bei freier Rotation müßten beide Protonen äquivalent sein, sofern nicht andere Effekte wie H-Brücken die freie Drehbarkeit verhindern. Es wurden daher solche Vergleichsverbindungen ausgewählt, die oben gezeigte Teilstruktur aufweisen, aber verschiedene Reste X besitzen. In Frage kommen das DCI, 2,6-Dichlorchinon-4-oxim und das entsprechende 4-Semicarbazon. Die beiden letzteren Verbindungen lassen sich durch tautomere Formen wiedergeben, in denen die freie Drehbarkeit um die C-N-Achse möglich ist.

4.3.2 DCI und 2,6-Dichlorchinon-4-oxim

Das ^{1}H-NMR-Spektrum von DCI (Abb.17) zeigt zwei Dubletts bei 7.85 ppm und 8.07 ppm mit der Kopplungskonstanten von 2,44 Hz. Dies bedeutet, daß die beiden Protonen H_A und H_B chemisch nicht äquivalent sind. Wie aus Abb.17 hervorgeht, steht das Proton H_A in räumlicher Nähe zum Chloratom der Chloriminogruppe und absorbiert deshalb bei tieferem Feld. Das Proton H_B erscheint demzufolge bei höherem Feld (7.85 ppm).

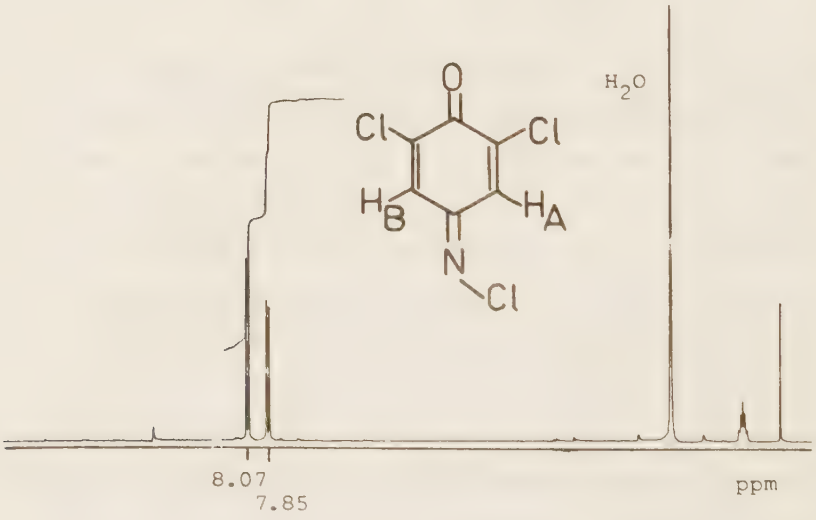


Abb.17: 80 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum von DCI in DMSO-d_6

Strukturell ähnliche Verhältnisse liegen im 2,6-Dichlorchinon-4-oxim vor. Die Synthese erfolgte in Anlehnung an KEHRMANN[24] aus 2,6-Dichlorchinon und Hydroxylaminhydrochlorid.

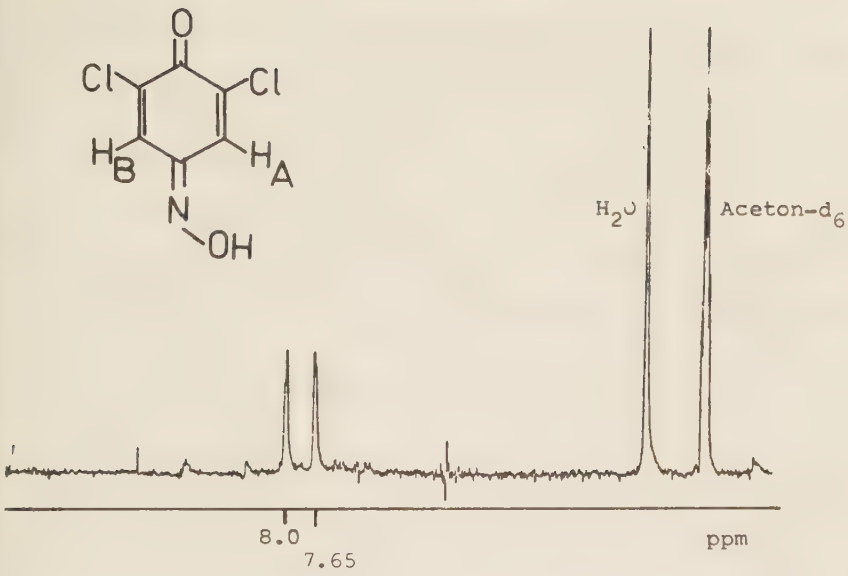
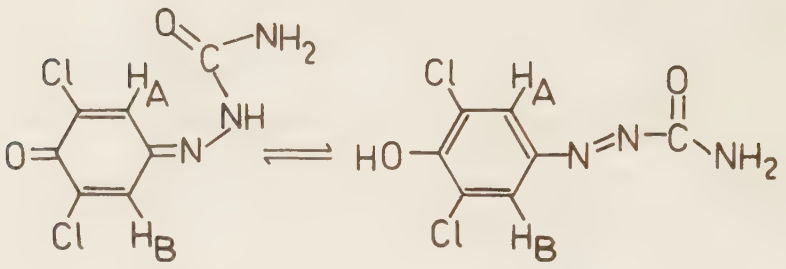


Abb.18: 80 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum von 2,6-Dichlorchinon-4-oxim in Aceton-d_6

Das Proton H_A tritt infolge Wechselwirkung mit dem Oximsauerstoff bei tieferem Feld in Resonanz (8.0 ppm), während das Proton H_B bei 7.65 ppm absorbiert (Abb.18). Die Kopplung zwischen H_A und H_B ist jedoch nur in der Anspaltung der beiden Signale zu erkennen. Setzt man der Meßlösung einen Tropfen Säure zu, so erhält man für die beiden Protonen H_A und H_B ein gemitteltes Signal bei 7.82 ppm. Nach NORRIS und STERNHELL[25] stellt sich bei Zugabe von Säure ein Gleichgewicht zwischen syn- und anti-Formen von 2,6-unsymmetrisch substituierten Chinonoximen ein. Die Gleichgewichtseinstellung soll über die tautomere Nitrosoform verlaufen.

4.3.3 2,6-Dichlorchinon-4-semicarbazon



" chinoide Form" "Azoform"

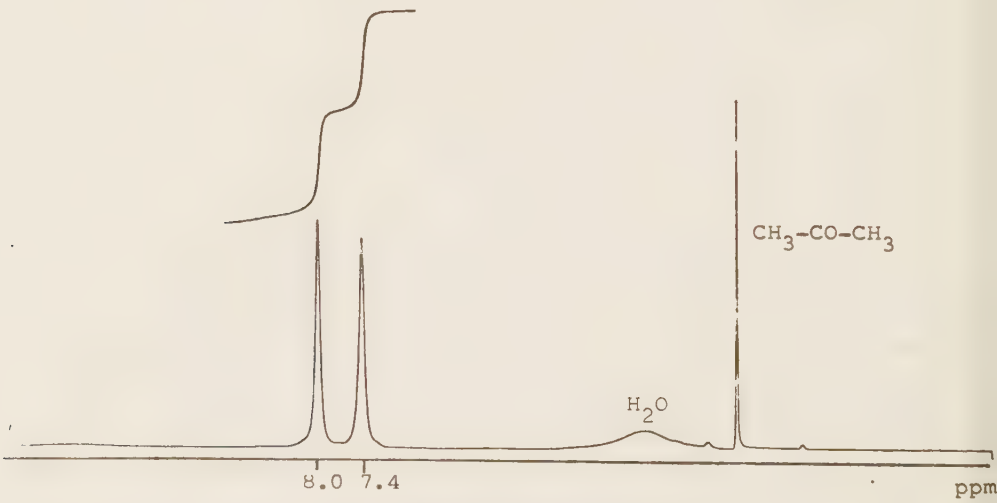


Abb.19: 80 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum von 2,6-Dichlorchinon-4-semicarbazon in DMSO-d_6

Eine in diesem Zusammenhang interessante Substanz ist das Semicarbazon des 2,6-Dichlorchinons. Es ist nach HEILBRON

und HENDERSON[26] zugänglich durch Umsetzung des Chinons mit Semicarbazidhydrochlorid. Die Verbindung kann auch durch eine weitere tautomere Form beschrieben werden, die HEILBRON und HENDERSON[26] als 3,5-Dichlor-4-hydroxyphenyl-azoformamid bezeichneten. In diesem Tautomer kann der Phenylrest über die Azogruppe mit der Carbonylgruppe in Konjugation treten, so daß sich ein ausgedehntes mesomeres System ausbilden kann. Das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb.19) zeigt für die Protonen H_A und H_B zwei Singuletts bei 8.0 ppm und 7.4 ppm. Eine Kopplung wird aufgrund der Signalverbreiterung infolge ^{14}N-Quadrupolmoment des benachbarten Stickstoffatoms nicht aufgelöst. Die Inäquivalenz der beiden Protonen deutet auch hier auf das Vorliegen der chinoiden tautomeren Form hin. Dort kann zwischen dem Semicarbazidcarbonylkohlenstoff und dem Proton H_A eine Wasserstoffbrückenbindung formuliert werden. Dadurch wird dieses Proton zu tieferem Feld (8.0 ppm) verschoben. Das Signal bei 7.4 ppm gehört somit zum Proton H_B.

4.3.4 Vergleich mit Farbstoffsalz

Der Vergleich der ^{1}H-NMR-Daten der Vergleichsverbindungen mit denen des Farbstoffsalzes (Tab.4) zeigt, daß im Farbstoffsalz andere Verhältnisse vorliegen müssen.

Tab.4: Gegenüberstellung der ^{1}H-NMR-Daten der Vergleichsverbindungen und des Farbstoffsalzes

2,6-Dichlorchinon	H_A (ppm)	H_B (ppm)	J_{meta} (Hz)
4-chlorimin	8.07	7.85	2,44
4-oxim	8.0	7.65	Anspaltung nicht aufgelöst
4-semicarbazon	8.0	7.4	
Farbstoffsalz	7.8		--

Wie aus den ^{1}H-NMR-Daten hervorgeht, liegen allen Vergleichsverbindungen in der chinoiden Form vor. Die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der Protonen H_A und H_B liegen zwischen 0.22 ppm und 0.6 ppm. Im Spektrum des Farbstoffsalzes dagegen erhält man für beide Protonen nur ein Signal, dessen chemische Verschiebung zwischen den ppm-Werten für die Protonen H_A und H_B der Vergleichsverbindungen liegen. Die Äquivalenz der Protonen des Farbstoffsalzes kann mit der freien Drehbarkeit des Dichlorchinoniminringes um die C-N-Achse erklärt werden, die bei den anderen Chinonimin-Derivaten nicht gegeben ist, wie aus deren ^{1}H-NMR-Spektren hervorgeht.
Zur Beschreibung der Verhältnisse im Farbstoffsalz müssen daher beide mesomeren Grenzformeln (Abb.16) herangezogen werden. Die freie Drehbarkeit des Dichlorchinonimin-Teils und die damit verbundene Äquivalenz der Protonen läßt sich anhand der aromatischen mesomeren Grenzformel erklären.

4.4 ^{13}C-NMR-Spektren

4.4.1 Vorbemerkung

Bei der Aufnahme der ^{13}C-NMR-Spektren des Farbstoffsalzes traten einige Schwierigkeiten auf. Das größte Problem lag dabei in der geringen Stabilität des Farbstoffsalzes in Lösungen. Weiter machte sich die geringe Löslichkeit negativ bemerkbar, denn dadurch mußten längere Meßzeiten in Kauf genommen werden. Außerdem enthält das Farbstoffmolekül fast nur quartäre Kohlenstoffatome, die in ^{13}C-NMR-Spektren Signale mit geringer Intensität liefern. Dies ist auf das Fehlen des sonst auftretenden Intensitätsgewinns mit Hilfe des heteronuklearen Kern-Overhauser-Effektes zurückzuführen. Zudem erscheinen manche Signale aufgrund des Quadrupolmoments der Stickstoffkerne mit verstärkter Linienbreite.
Für diese Messungen erwies sich DMSO-d_6 als das geeignetste Lösungsmittel. Darin war das Farbstoffsalz am längsten stabil. Von Vorteil war außerdem, daß ein direkter Vergleich der erhaltenen Spektren mit denen der Harnsäure, die ebenfalls in DMSO-d_6 aufgenommen wurden, möglich war.

4.4.2 Farbstoffsalz

Das vorliegende Spektrum (Abb.20) zeigt für die elf Kohlenstoffe des Farbstoffmoleküls neun Signale. Dies bedeutet, daß hier zwei Paare von äquivalenten C-Atomen vorliegen müssen. Infrage kommen dafür nur die C-Atome C-2' und C-6' sowie C-3' und C-5' im DCI-Teil des Moleküls.

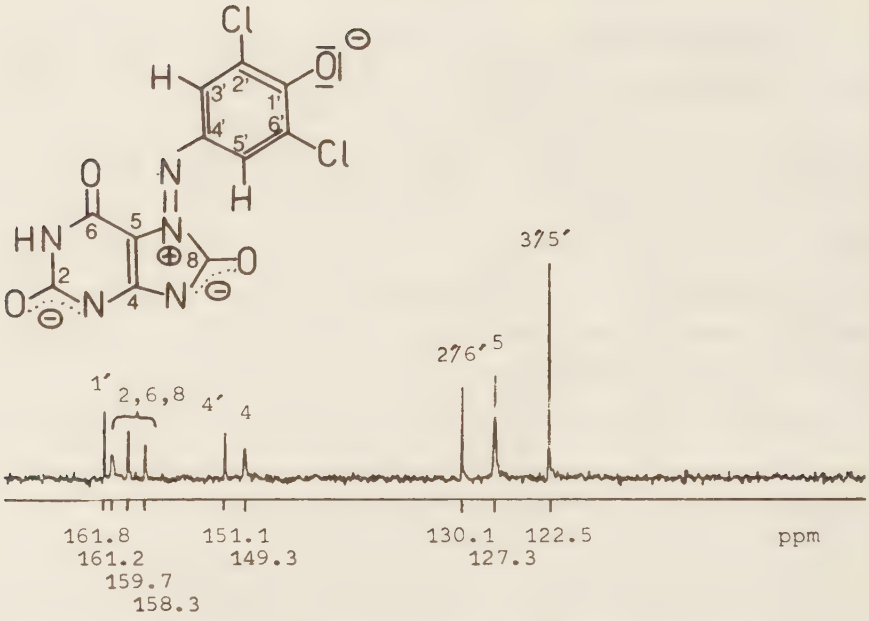


Abb.20: 20,115 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum des Farbstoffsalzes in DMSO-d_6, protonenbreitbandentkoppelt

Das intensivste Signal bei 122.5 ppm muß wegen des NOE-Effektes der direkt gebundenen Protonen den Kohlenstoffen C-3' und C-5' zugeordnet werden.

Das Signal mit der chemischen Verschiebung von 161.8 ppm gehört zum C-1' des DCI-Ringes. Auffällig ist dessen Hochfeldverschiebung im Vergleich zu anderen Chinonen, deren Carbonylkohlenstoffe im Bereich von 180 ppm absorbieren[16]. Die übrigen drei Carbonylresonanzen bei 158.3 ppm, 159.7 ppm und 161.2 ppm passen zu den Kohlenstoffen C-2, C-6 und C-8 im Harnsäureteil des Moleküls. Im Vergleich zur Harnsäure selbst sind sie um durchschnittlich 8 ppm zu tieferem Feld verschoben.

Eine eindeutige Zuordnung kann aber nicht getroffen werden. Der Iminkohlenstoff C-4' erscheint bei 151.1 ppm im erwarteten Bereich der Azomethinresonanzen. Die drei restlichen olefinischen Kohlenstoffe lassen sich aufgrund unterschiedlicher Nachbaratome unterscheiden. So tritt C-4 wegen der zwei Stickstoffatome bei etwas tieferem Feld, bei 149.3 ppm, in Resonanz. In der Harnsäure beträgt dessen chemische Verschiebung 136.7 ppm, im Farbstoffsalz ist er also um 12.6 ppm zu tieferem Feld verschoben. Die jeweils mit einem Chloratom substituierten Kohlenstoffe C-2' und C-6' erscheinen bei 130.1 ppm, sie sind wie C-3' und C-5' chemisch äquivalent. Für das C-5 bleibt damit nur das Signal bei 127.3 ppm übrig, es ist im Vergleich zur Harnsäure um 30.1 ppm zu tieferem Feld verschoben. H. METZGER[1)] fand bei ihrem Farbstoffsalzspektrum ähnliche Verhältnisse vor. Sie erhielt jedoch eine Verdopplung aller Signale.

Vergleicht man die chemischen Verschiebungen der einzelnen Kohlenstoffe der Harnsäure mit den entsprechenden des Farbstoffsalzes, so fällt auf, daß im Farbstoffsalz diese C-Atome alle mehr oder weniger zu tieferem Feld verschoben sind. Dies kann mit dem starken Elektronenzug des DCI-Ringes erklärt werden. Am stärksten tieffeldverschoben ist dabei das C-Atom 5 des Harnsäureteils. Es kann also daraus geschlossen werden, daß der Angriffspunkt des DCI das Stickstoffatom N-7 ist, das in Nachbarstellung zum C-5 steht. Wie aus den mesomeren Grenzformeln in Abb.16 hervorgeht, wird N-7 dadurch stark positiviert, was auch eine Positivierung des C-5 zur Folge hat.

4.4.3 Gegenüberstellung von Farbstoffsalz und Farbstoffsäure

Ein Vergleich der ^{13}C-NMR-Daten des Farbstoffsalzes mit den entsprechenden Werten der Farbstoffsäure von H. METZGER[1] (Tab.5) zeigt für den Harnsäureteil der Molekel größere Unterschiede in den chemischen Verschiebungen als im Dichlorchinoniminteil. Dies ist auf die Salzbildung an den Stickstoffen N-3 und N-9 des Harnsäureteils zurückzuführen.

Tab.5: Gegenüberstellung der ^{13}C-NMR-Daten des Farbstoffsalzes und der Farbstoffsäure von H. METZGER[1]

C-Atom	δ Farbstoffsalz in DMSO-d_6 (ppm)	δ Farbstoffsäure[1] in Aceton-d_6 (ppm)	Δ (ppm) δ Salz - δ Säure
C-2*	161.2	158.15	3.05
C-6*	158.2	156.15	2.05
C-8*	159.7	157.2	2.5
C-4	149.3	144.8	4.5
C-5	127.3	123.25	4.05
C-1'	161.8	161.7	0.1
C-2'/6'	130.1	131.25	-1.15
C-3'/5'	122.5	122.8	-0.3
C-4'	151.1	148.95	2.15

* Zuordnung austauschbar

positives Δ = Hochfeldverschiebung

negatives Δ = Tieffeldverschiebung

Dabei zeigen die Kohlenstoffe C-2, C-4 und C-8, die diesen Stickstoffen benachbart sind, die größten Unterschiede. Die Tieffeldverschiebung der Kohlenstoffe des Harnsäureteils im Farbstoffsalz gegenüber denen in der Säure steht im Einklang mit entsprechenden Untersuchungen bei Purin und Hypoxanthin[27-29].

4.5 ^{13}C-NMR-Spektren einiger Vergleichsverbindungen

4.5.1 Vorbemerkung

Die ^{1}H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen zeigten, daß für das Farbstoffsalz zwei mesomere Grenzformeln formuliert werden müssen (Abb.16), damit dessen Verhalten richtig beschrieben werden kann. Dies wurde durch das ^{13}C-NMR-Spektrum bestätigt. Zur genauen Einordnung der ^{13}C-chemischen Verschiebungen sollten solche Verbindungen vermessen werden, die den jeweiligen Grenzformeln des Farbstoffsalzes strukturell nahekommen. Als Vertreter der Chinone kamen das DCI und 2,6-Dichlorchinon in Betracht, während sich als aromatische Verbindung des 2,6-Dichlor-4-aminophenol anbot.

4.5.2 2,6-Dichlorchinon-4-chlorimin (DCI)

Das ^{13}C-NMR-Spektrum von DCI (Abb.21) zeigt für die sechs Kohlenstoffe sechs Signale. Die beiden intensivsten bei 125.6 ppm und 135.5 ppm gehören aufgrund der Intensitätserhöhung durch den Kern-Overhauser-Effekt der direkt gebundenen Protonen zu den Kohlenstoffen C-3 und C-5. Infolge der

Wechselwirkung mit dem Chloratom am Iminstickstoff absorbiert C-3 bei tieferem Feld als C-5. Für das Signalpaar bei 137.0 ppm und 142.5 ppm, das zu den chlorsubstituierten Kohlenstoffen C-2 und C-6 paßt, gilt dieselbe Überlegung.

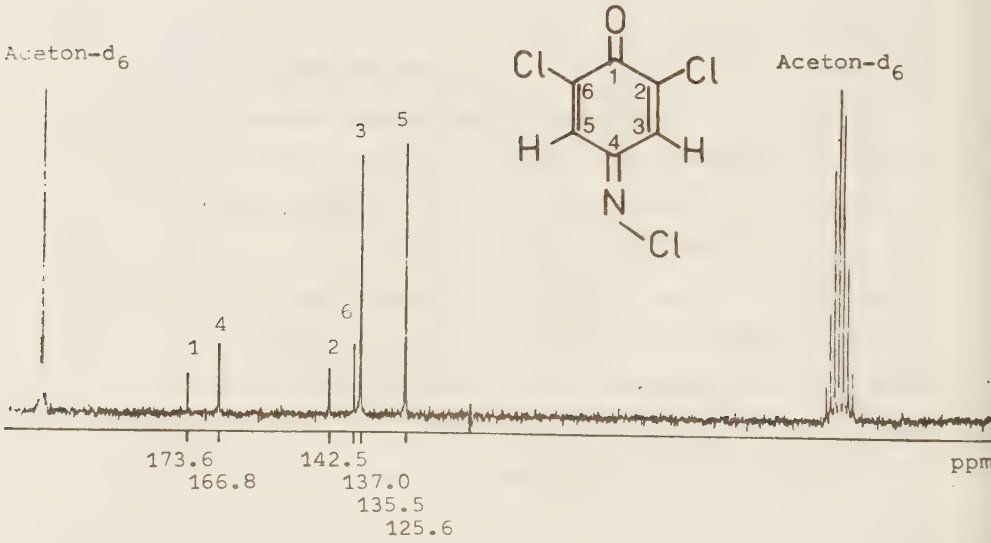
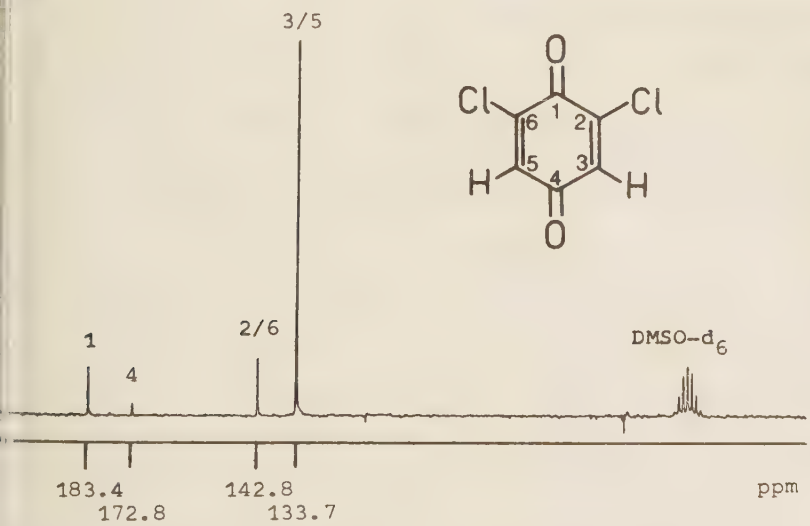


Abb.21: 20,115 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum von DCI in Aceton-d_6, protonenbreitbandentkoppelt

Demnach gehört das Signal bei 142.5 ppm zum Kohlenstoff C-2, während C-6 bei 137.0 ppm in Resonanz tritt. Der Carbonylkohlenstoff C-1 absorbiert bei 173.6 ppm, so daß für den Chloriminkohlenstoff C-4 nur die Verschiebung von 166.8 ppm übrigbleibt.

.5.3 2,6-Dichlorchinon

,6-Dichlorchinon wurde nach EISTERT, RIEDINGER, KÜFFNER nd LAZIK[30] durch Oxidation von 2,6-Dichlor-4-aminophenol mit liumdichromat in Schwefelsäure synthetisiert. Es ist n symmetrisch substituiertes Chinon, dessen ^{13}C-NMR-Spektrum für die sechs C-Atome nur vier Signale zeigen sollte. n der Chinoniminteil des Farbstoffsalzes auch nur vier Signale zeigt, könnte dies einen Vergleich erleichtern.



b.22: 20,115 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum von 2,6-Dichlorchinon in DMSO-d_6, protonenbreitbandentkoppelt

as ^{13}C-NMR-Spektrum (Abb.22) zeigt die erwarteten vier Signale. Leicht zuzuordnen ist dabei das NOE-verstärkte Signal ei 133.7 ppm, es gehört zu den Kohlenstoffen C-3 und C-5.

Die zwei chlorsubstituierten Kohlenstoffe C-2 und C-6 absorbieren bei etwas tieferem Feld bei 142.8 ppm. Die beiden Carbonylkohlenstoffe C-1 und C-4 erscheinen bei 183.4 ppm und 172.8 ppm. Da das Kohlenstoffatom C-1 den beiden Chloratomen in Stellung 2 und 6 räumlich näher steht und somit eher durch deren -I-Effekt positiviert wird, gehört ihm das Signal bei 183.4 ppm. Damit bleibt für den Kohlenstoff C-4 nur die Resonanz bei 172.8 ppm.

4.5.4 2,6-Dichlor-4-aminophenol

2,6-Dichlor-4-aminophenol ist nach ADAMS und LOOKER[31] zugänglich durch Reduktion von 2,6-Dichlor-4-nitrophenol mit Natriumdithionit im natronalkalischen Milieu. Das ^{13}C-NMR-Spektrum (Abb.23) zeigt im Aromatenbereich vier Signale.

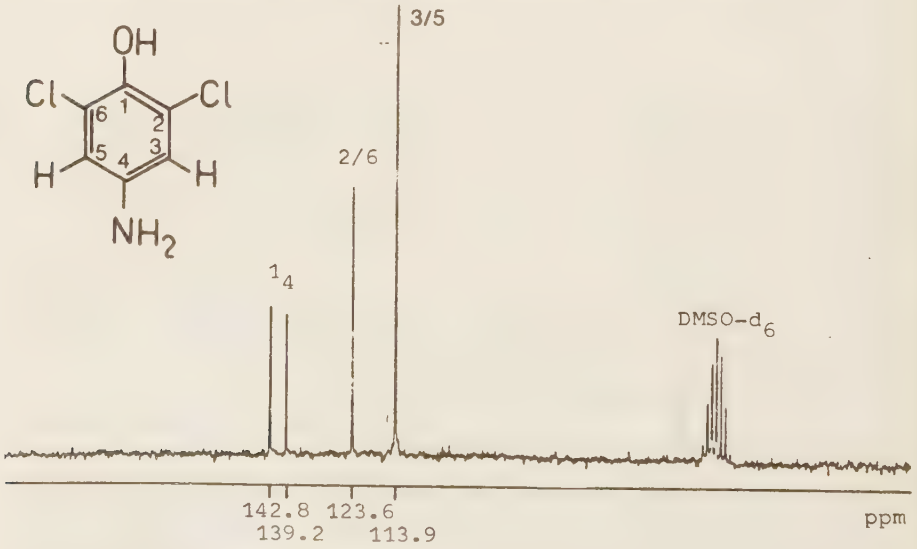


Abb.23: 20,115 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum von 2,6-Dichlor-4-aminophenol in DMSO-d_6, protonenbreitbandentkoppelt

Tab.5: Inkrementberechnung der ^{13}C-chemischen Verschiebungen für 2,6-Dichlor-4-aminophenol

C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
128.5	128.5	128.5	128.5	128.5	128.5
$_1$OH 26.9	z_{0OH} -12.6	z_{mOH} 1.6	z_{pOH} -7.6	z_{mOH} 1.6	z_{0OH} -12.6
$_0$Cl 0.2	z_{1Cl} 6.4	z_{0Cl} 0.2	z_{mCl} 1.0	z_{pCl} -2.0	z_{mCl} 1.0
$_m$NH$_2$ -9.5	z_{mNH_2} 1.3	z_{0NH_2} -12.4	z_{1NH_2} 19.2	z_{0NH_2} -12.4	z_{mNH_2} 1.3
$_0$Cl 0.2	z_{mCl} 1.0	z_{pCl} -2.0	z_{mCl} 1.0	z_{0Cl} 0.2	z_{1Cl} 6.4
146.3	124.6	115.9	142.1	115.9	124.6
(Schätzwerte)					
142.8	123.6	113.9	139.2	113.9	123.6
(Meßwerte in DMSO-d_6)					

Die Zuordnung gelingt durch Inkrementabschätzung der ^{13}C-chemischen Verschiebungen[32] (Tab.5). Die berechneten Werte zeigen gute Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Daten. Eindeutig zugeordnet werden kann das Kohlenstoffpaar C-3/C-5 infolge NOE-Intensitätserhöhung, zu ihm paßt das Signal bei 113.9 ppm. Die Kohlenstoffe C-2 und C-6 absorbieren bei etwas tieferem Feld bei 123.6 ppm, der berechnete Wert von 124.6 ppm bestätigt dies. Für die beiden restlichen C-Atome weichen die abgeschätzten Werte etwas stärker von den experimentellen ab. Sie bestätigen aber die Vorstellung, daß der Kohlenstoff C-1 bei tieferem Feld als C-4 erscheint. Somit gehört das Signal bei 142.8 ppm zu C-1, während C-4 bei 139.2 ppm in Resonanz tritt.

4.5.5 Vergleich mit Farbstoffsalz

Der Vergleich der in Tab.6 aufgeführten Daten zeigt, daß die chemischen Verschiebungen des Farbstoffsalzes zwischen denen des Aminophenols und denen der beiden Chinone liegen.

Tab.6: Gegenüberstellung der ^{13}C-chemischen Verschiebungen des DCI-Teils im Farbstoffsalz und einiger Vergleichsverbindungen

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
2,6-Dichlor-4-aminophenol (DMSO-d_6)	142.8	123.6	113.9	139.2	113.9	123.6
Farbstoffsalz (DMSO-d_6)	161.8	130.1	122.5	151.1	122.5	130.1
DCI (Aceton-d_6)	173.6	142.5	135.5	166.8	125.6	137.0
2,6-Dichlorchinon (DMSO-d_6)	183.4	142.8	133.7	172.8	135.7	142.8

Besonders interessant ist dabei der Kohlenstoff C-1 mit der Verschiebung von 161.8 ppm im Farbstoffsalz. Für einen Chinoncarbonylkohlenstoff ist dieser Wert zu gering, denn im DCI absorbiert das entsprechende C-Atom bei 173.6 ppm und im 2,6-Dichlorchinon bei 183.4 ppm. Auf der anderen Seite liegt er für einen Phenylkohlenstoff zu hoch, wenn man berücksichtigt, daß im Farbstoffsalz die aromatische Grenzformel genau genommen als Phenolat betrachtet werden muß. Die beiden Kohlenstoffpaare C-3/C-5 und C-2/C-6 im Farbstoffsalz sind gegenüber den entsprechenden C-Atomen der beiden Chinone stark hochfeldverschoben. Eine Erklärung liegt in der Tatsache, daß das stark

elektronegative Chloratom am Iminstickstoff durch einen Harnsäurestickstoff ersetzt ist, der dem DCI-Ring sein freies Elektronenpaar zu dessen Aromatisierung zur Verfügung stellen kann. Die dadurch im DCI-Ring auftretende negative Ladung führt zu der beschriebenen Hochfeldverschiebung. Der Kohlenstoff C-4 im DCI-Ringsystem des Farbstoffsalzes liegt im Bereich der Azomethinkohlenstoffe, der von 145 ppm bis 165 ppm reicht[33]. Seine chemische Verschiebung von 151.1 ppm könnte aber auch zu einem Phenylazokohlenstoff passen. Im trans-Azobenzol erscheint er bei 152.75 ppm[34]. Rechnet man zu diesem Wert noch die Inkremente für die Hydroxylgruppe in Parastellung sowie für die beiden Chloratome in Metastellung hinzu, so erhält man einen Wert von 147.15 ppm. Dieser Vergleich zeigt, daß im Farbstoffsalz die beiden in Abb.16 gezeigten mesomeren Grenzformeln gleichberechtigt nebeneinander vorliegen und daß keine der beiden Grenzformeln, isoliert betrachtet, die Verhältnisse im Farbstoffsalz richtig wiedergibt.

4.6 ^{13}C-NMR-Spektrum des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes

Vergleicht man das ^{13}C-NMR-Spektrum des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes (Abb.24) mit dem entsprechenden Spektrum des unmarkierten Farbstoffsalzes (Abb.20), so fällt folgendes auf: Drei Signale zeigen Dubletts infolge ^{13}C-^{15}N-Kopplungen. Das Signal bei 161.2 ppm des unmarkierten

Farbstoffsalzes verschwindet im Rauschen. Im Spektrum der ^{15}N-markierten Verbindung erkennt man ein zusätzliches Signal bei 123.9 ppm, das zu einer Verunreinigung gehören dürfte.

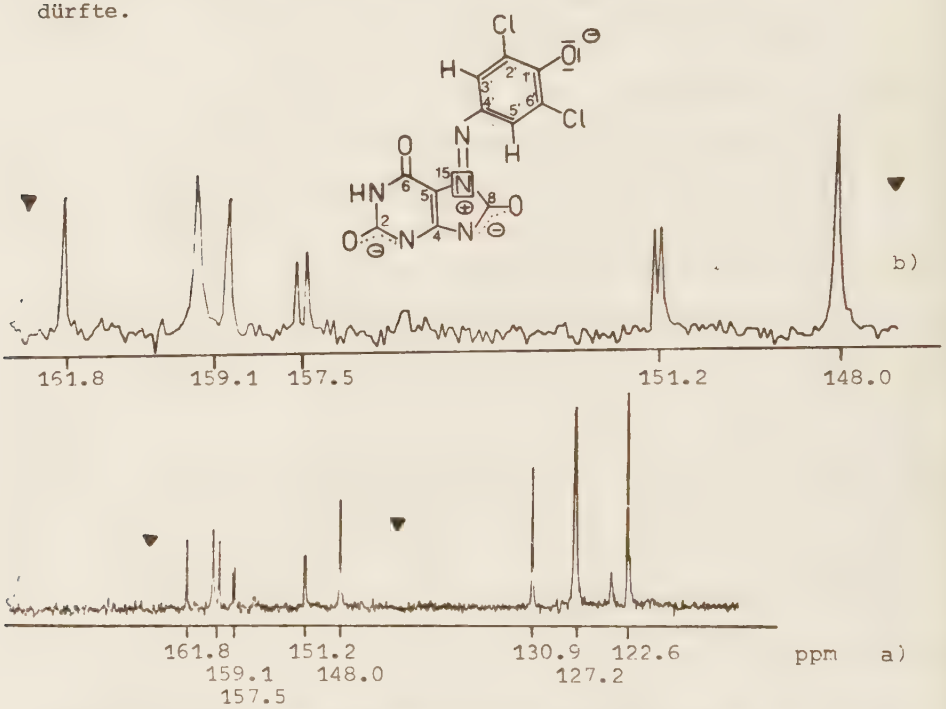


Abb.24: a) 20,115 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes in DMSO-d_6, protonenbreitbandentkoppelt

b) gespreizter Teilbereich

Die Zuordnung der drei Carbonylkohlenstoffe, die mit Hilfe des Spektrums des unmarkierten Farbstoffes nicht getroffen werden konnte, gelingt nun durch Analyse der ^{13}C-^{15}N-Kopplungen. Das Signal bei 159.1 ppm zeigt eine Kopplungskonstante von 12,2 Hz, dies entspricht einer direkten Kopplung über eine Bindung, so daß dieses Signal zu C-8 gehört. Kopplungskonstante von 3,7 Hz des Signals bei 157.5 ppm zeigt, daß dieses Signal zu C-6 paßt. Für C-2 bleibt nur das Signal bei 161.2 ppm, das allerdings im Rauschen verschwindet. Der Iminkohlenstoff C-4' zeigt ebenfalls ein Dublett mit der Kopplungskonstanten von 2,4 Hz, er absorbiert bei 151.2 ppm. Auffallend ist, daß die Kohlenstoffe C-4 und C-5 keine ^{13}C-^{15}N-Kopplungen zeigen, obwohl dies bei der Harnsäure[7-^{15}N] der Fall war.

Tab.7: Gegenüberstellung der ^{13}C-NMR-Daten der Harnsäure[7-^{15}N] des unmarkierten und des 7-^{15}N-markierten Farbstoffsalzes sowie von DCI

	Harnsäure[7-^{15}N] (DMSO-d_6)	DCI (Aceton)	Farbstoffsalz (DMSO-d_6)	7-^{15}N-markiertes Farbstoffsalz (DMSO-d_6)
C-2	150.2		161.2	--
C-4	136.7 (J_{CN} = 1,8 Hz)		149.3	148.0
C-5	97.2 (J_{CN} = 17,1 Hz)		127.3	127.2
C-6	153.5 (J_{CN} = 1,8 Hz)		158.2	157.5 (J_{NC}= 3,7 Hz)
C-8	152.4 (J_{CN} = 20,1 Hz)		159.7	159.1 (J_{NC}=12.2 Hz)
C-1'	--	173.6	161.8	161.8
C-2'	--	142.5	130.1	130.9
C-6'	--	137.0		
C-3'	--	135.5	122.5	122.6
C-5'	--	125.6		
C-4'	--	166.8	151.1	151.2 (J_{NC}= 2,4 Hz)

Vergleicht man die Beträge der Kopplungskonstanten $^1J_{CN}$ für den Kohlenstoff C-8 der Harnsäure[7-^{15}N] und des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes miteinander (Tab.7), so stellt man fest, daß diese Kopplung im Farbstoffsalz geringer ist. Genau umgekehrt verhält sich der Kohlenstoff C-6. Dort ist die $^2J_{CN}$-Kopplung im Farbstoffsalz größer.

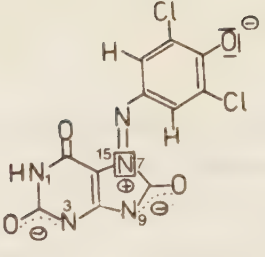
Im allgemeinen nimmt die Kopplungskonstante J_{CN} direkt verknüpfter ^{15}N und ^{13}C-Kerne mit dem s-Charakter der zur Bindung beitragenden Hybridorbitale zu. Ein weiterer Einfluß, der den Betrag der J_{CN}-Kopplung vergrößert, ist die erhöhte positive Ladungsdichte an einem Kopplungspartner infolge von Protonierung, induktiven oder mesomeren Effekten. Auch die $^2J_{CN}$-Kopplung wird von Hybridisierung und Bindungspolarität beeinflußt. Sie wird jedoch im wesentlichen durch die Orientierung des nichtbindenden Elektronenpaares am Stickstoff beeinflußt[35)].

Eine Vergrößerung der $^2J_{CN}$-Kopplung des Kohlenstoffes C-6 kann also durch die Positivierung des Stickstoffes ^{15}N-7 infolge DCI-Kupplung erklärt werden. Die Verminderung der $^1J_{CN}$-Kopplung für den Carbonylkohlenstoff C-8 ist auf die Tatsache zurückzuführen, daß der Farbstoff als Dianion vorliegt. Eine der beiden negativen Ladungen ist dabei über die Atome N-9, C-8 und den daran gebundenen Sauerstoff verteilt, so daß dem Kohlenstoff C-8 zumindest eine negative Teilladung zugeschrieben werden kann. Die zweite negative Ladung ist über die Positionen N-3, C-2 und den daran gebundenen Sauerstoff verteilt.

Beide Ladungen beeinflußen die Kohlenstoffes C-4 und C-5, wie aus dem Verschiebungsvergleich mit der Farbstoffsäure (siehe 4.4.3) hervorgeht. Die dadurch bedingte Negativierung dieser C-Atome könnte eine Erklärung für das Ausbleiben der ^{13}C-^{15}N-Kopplungen für C-4 und C-5 sein.
Die Analyse der ^{13}C-^{15}N-Kopplungen im ^{13}C-NMR-Spektrum des 7-^{15}N-markierten Farbstoffsalzes erlaubt zwar keine eindeutige Aussage zugunsten der in Abb.16 vorgeschlagenen Struktur des Farbstoffes, die Größe der ermittelten Kopplungskonstanten und die Tatsache, daß C-4' im DCI-Ring eine $^{2}J_{CN}$-Kopplung zeigt, sprechen jedoch für diese Struktur.

4.7 ^{15}N-NMR-Spektrum des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes

Das ^{15}N-NMR-Spektrum der Harnsäure 7-^{15}N (Abb.13) wies ein Signal bei 68.1 ppm mit einer $^{1}J_{NH}$-Kopplung von 97,0 Hz auf. Dieser Wert lag im Bereich der Harnstoff-Stickstoffe von 60 bis 120 ppm[35]. Das protonenentkoppelte ^{15}N-NMR-Spektrum des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes (Abb.25 a) zeigt ein Singulett bei 184.1 ppm, bezogen auf den Standard Ammoniak (0.0 ppm). Diese Verschiebung liegt schon im Bereich der Iminoresonanzen, der mit 150 bis 300 ppm angegeben wird[35]. In diesem Intervall absorbieren Aminostickstoffe von Nitraminen (150 bis 190 ppm) oder Aminostickstoffe von Hydrazonen (um 150 ppm), deren Iminostickstoffe bei 320 ppm erscheinen[36].



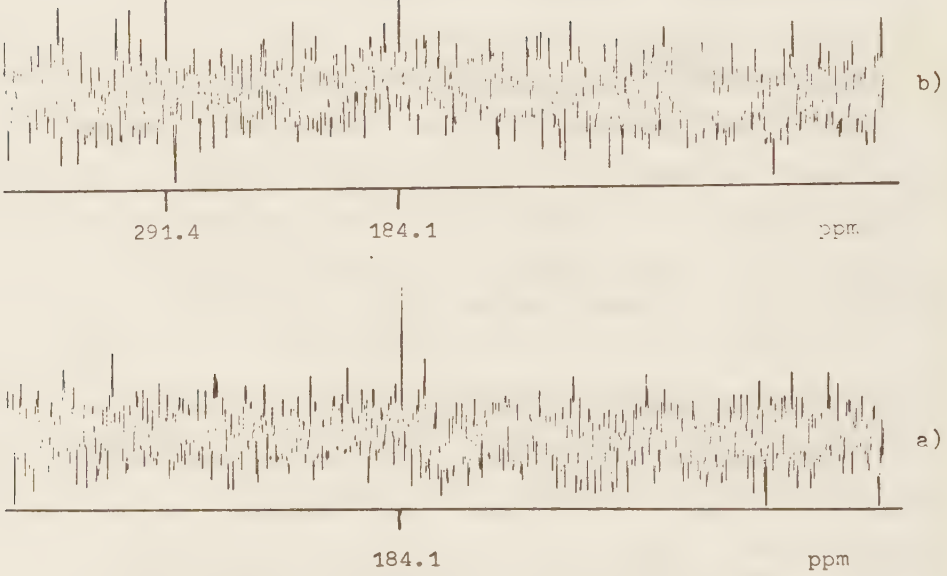


Abb.25: 9,12 MHz-^{15}N-NMR-Spektren des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes in DMSO-d_6

a) protonenbreitbandentkoppelt

b) gekoppelt

Im gekoppelten Spektrum (Abb.25 b) spaltet das Signal bei 184.1 ppm nicht auf. Außerdem erkennt man in diesem Spektrum ein weiteres Singulett bei 294.1 ppm, das aber im entkoppelten Spektrum nicht auftaucht. Aus diesem Grund scheint es nicht zum Farbstoffsalz zu gehören. Es könnte ein Hinweis auf beginnende Zersetzung der Probe sein, da zuerst das entkoppelte und dann das gekoppelte Spektrum der gleichen Probenlösung gemessen wurde.

Tab.8: Gegenüberstellung der ^{15}N-NMR-Daten der Harnsäure[7-^{15}N] und des 7-^{15}N-markierten Farbstoffsalzes in DMSO-d_6 aufgenommen

	N-7 (ppm)	$^1J_{NH}$ Hz)
Harnsäure[7-^{15}N]	68.1	97,0
7-^{15}N-markiertes Farbstoffsalz	184.1	--

Vergleicht man diese Resultate mit den Daten der Harnsäure[7-^{15}N] (Tab.8), so stellt man für das Stickstoffatom ^{15}N-7 des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes eine Tieffeldverschiebung von 116 ppm fest. Außerdem fehlt die bei Harnsäure[7-^{15}N] beobachtete große $^1J_{NH}$-Kopplung.

^{15}N-chemische Verschiebungen sind dann groß, wenn sich das betreffende Stickstoffatom an Mehrfachbindungen beteiligt und wenn diese Mehrfachbindungen stark polarisiert sind[35]. Betrachtet man die in Abb.16 angegebene Struktur des Farbstoffsalzes, so trifft dort beides zu. Auf der einen Seite hat die N-N-Bindung zwischen dem Stickstoff ^{15}N-7 und dem Chinominstickstoff partiellen Doppelbindungscharakter, auf der anderen Seite ist sie durch die positive Partialladung des ^{15}N-7 polarisiert.

Schon aus der chemischen Verschiebung des Stickstoffatomes ^{15}N-7 des 7-^{15}N-markierten Farbstoffsalzes läßt sich ein Hinweis auf die postulierte Struktur (Abb.16) ableiten. Untermauert wird dies durch die fehlende $^1J_{NH}$-Kopplung.

5 UNTERSUCHUNGEN ZUR STABILITÄT DES FARBSTOFFES

5.1 Vorbemerkung

Die größte Schwierigkeit bei der Handhabung des bei der Reaktion von Harnsäure mit DCI entstehenden Farbstoffes ist seine geringe Stabilität sowohl im Reaktionsmedium als auch in den meisten organischen Lösungsmitteln. Eine Ausnahme bildet dabei Dimethylsulfoxid, das deshalb als Lösungsmittel für kernresonanzspektroskopische Untersuchungen verwendet werden kann. Bei der Reaktionsmischung ließ sich die Zersetzung des Farbstoffes an der Farbänderung von Dunkelrot nach Braun erkennen. Wurde dieser Ansatz sofort mit Diethylether ausgeschüttelt, um überschüßiges DCI sowie dessen Hydrolyseprodukte zu entfernen, so konnte eine langsamere Verfärbung beobachtet werden. Dies bedeutet, daß neben der Zersetzung des Farbstoffes auch die Hydrolyse des DCI abläuft und daß beide Prozesse sich gegenseitig zu beeinflußen scheinen. Diese Vorgänge sollten durch Absorptionsmessungen um UV/Vis-Bereich noch deutlicher gemacht werden.

5.2 UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen des isolierten Farbstoffes

Zur Aufnahme der UV-Spektren des isolierten Farbstoffes wurde etwas Farbstoff in 2,0 ml 0,1M-Boratpuffer (pH 9,2) gelöst und gegen den Puffer selbst im Wellenlängebereich von 200 nm

---

Anmerkung: In diesem Kapitel wird nicht mehr zwischen Farbstoffsalzen und Farbstoffsäuren unterschieden, sondern für beide der Begriff Farbstoff verwendet.

bis 600 nm vermessen. Um die Zersetzung des Farbstoffes in diesem Milieu nachzuweisen, wurden im Abstand von 10 Minuten noch zwei weitere Messungen durchgeführt (Abb.26).

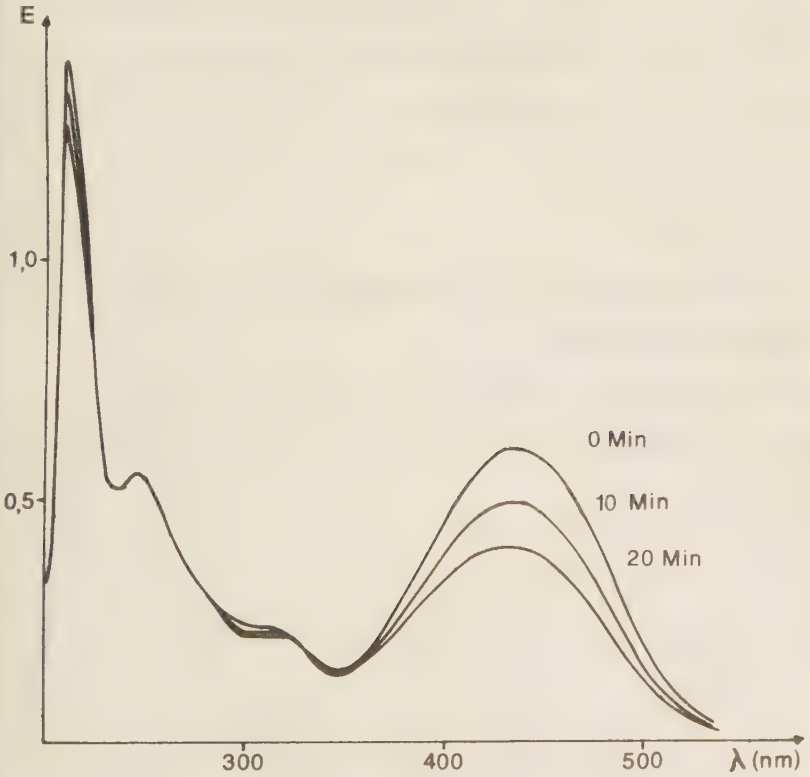


Abb.26: UV-Spektren des isolierten Farbstoffes in 0,1M-Boratpuffer (pH 9,2) sofort nach dem Auflösen, nach 10 Minuten und nach 20 Minuten

Die Farbigkeit der Verbindung geht auf die Absorption bei 436 nm zurück. Im ultravioletten Bereich ist noch ein Maximum bei 210 nm und eine Schulter bei 245 nm zu erkennen. Vergleicht man die drei Kurven miteinander, so stellt man eine zeitabhängige Abnahme der Extinktionen der beiden Maxima bei 436 und 210 nm fest. Dabei nimmt die Extinktion des Maximums bei 436 nm schneller ab als die des Maximums bei 210 nm. Die Schulter zeigt demgegenüber keine zeitabhängige Veränderung.

5.3 UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen unter praxisbezogenen Bedingungen

Für diese Untersuchungen wurde ein von METZGER[1] in Anlehnung an die Arbeitsweise von FEARON[2] verwendetes Pipettierschema zugrunde gelegt:

Probe	Referenz
0,3 ml Harnsäurelösung (5 mg/100 ml H_2O)	0,3 ml H_2O
2,0 ml Pufferverdünnung	(20 ml 0,1M-Boratpuffer pH 9,2 + 80 ml H_2O)
0,02 ml 2,6-Dichlorchinon-4-chlorimin-Lösung	(400 mg in 100 ml absol. Ethanol)

Auch mit diesem Ansatz wurde versucht, eine Farbkurve im Bereich zwischen 200 nm und 600 nm aufzunehmen und die zeitliche Abnahme der beiden Maxima bei 436 nm und 210 nm zu zeigen. Wie Abb.27 jedoch zeigt, konnten hier keine vollständigen Kurven aufgenommen werden. Nach Durchlaufen des Maximums bei 436 nm nahm die Extinktion kontinuierlich ab und erreichte bei 355 nm die Null-Linie.

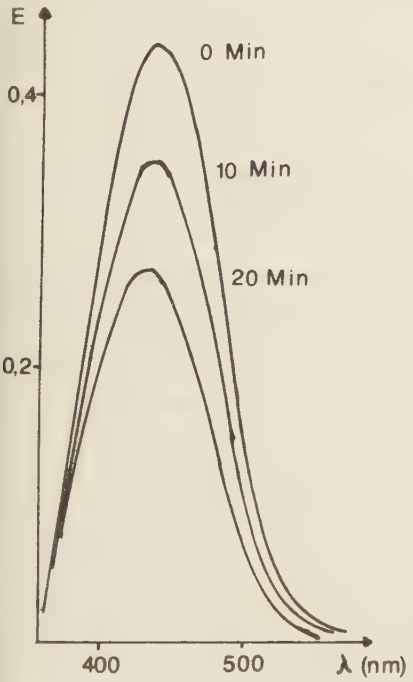


Abb.27: Absorptionsspektren des praxisbezogenen Ansatzes

Dieses Phänomen läßt sich durch eine plötzliche Zunahme der Extinktion in der Referenzküvette erklären. Vertauscht man bei 350 nm die Proben- und die Referenzküvette miteinander, so steigt die Extinktion wieder stark an.

Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde in einem weiteren Versuch die Referenzlösung des praxisbezogenen Ansatzes gegen reinen 0,1M-Boratpuffer (pH 9,2) vermessen. Wie Abb.28 zeigt, ist dieser plötzliche Extinktionsanstieg in der Referenzküvette auf die Absorptionsmaxima des DCI selbst zurückzuführen, die bei 209 nm, 281 nm, 304 nm und 312 nm liegen.

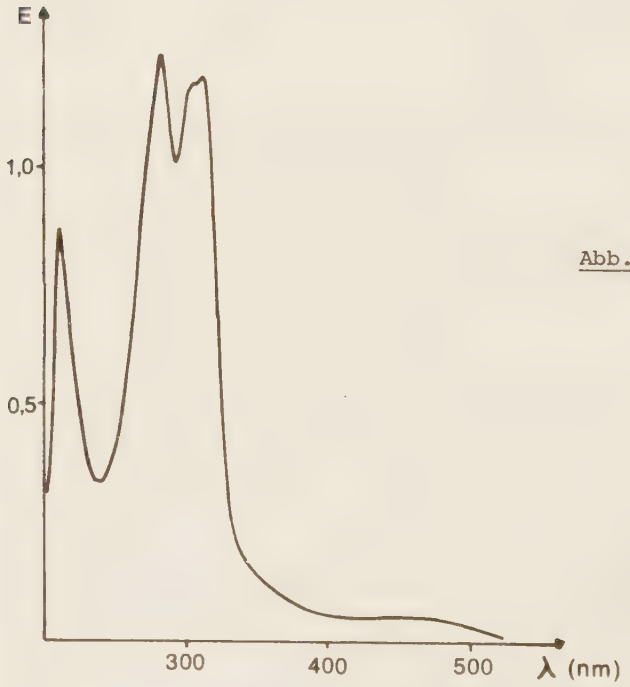


Abb.28: Absorptionsspektrum von DCI in 0,1M-Boratpuffer (pH 9,2)

Der praxisbezogene Ansatz zeigte wie der Farbstoff eine zeitliche Abnahme der Extinktion bei 436 nm (Abb.27). Zur weiteren Untersuchung dieser Tatsache genügt es deshalb, die Zeitabhängigkeit der Extinktion bei 436 nm zu ermitteln.

5.4 Untersuchung der zeitabhängigen Extinktionsabnahme bei 436 nm des Farbstoffes

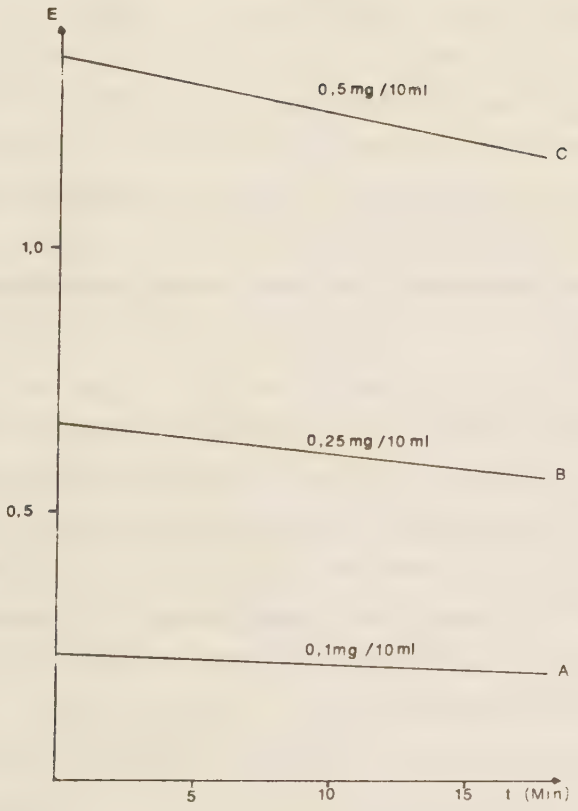


Abb.29: Die Extinktion bei 436 nm in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen gegen reine Pufferverdünnung gemessen.

Für diese Versuche wurden verschiedene Mengen Farbstoff (0,1 mg, 0,25 mg und 0,5 mg) in jeweils 10 ml Pufferverdünnung gelöst und die Abnahme der Extinktion bei 436 nm über einen Zeitraum von 15 Minuten gemessen. Als Referenz wurde reine Pufferverdünnung verwendet.
Man erkennt, daß die Extinktion linear pro Zeiteinheit abnimmt, wobei die Geschwindigkeit proportional zur Farbstoffkonzentration ist (Abb.29). Die Abnahme der Extinktion betrug nach 15 Minuten für A 0,024, bei B 0,078 und für C 0,159 Einheiten. Diese Resultate bestätigen die Befunde von METZGER[1]. Sie untersuchte die Zeitabhängigkeit der Extinktion anhand der Versuchsanordnung von FEARON[2] mit verschiedenen Harnsäurekonzentrationen und stellte dabei ebenfalls eine lineare Abnahme, die der Harnsäurekonzentration direkt proportional war, fest.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob die beschriebene Linearität auch über einen längeren Zeitraum als 15 Minuten auftritt. Dazu wurden 0,15 mg Farbstoff in 10 ml Pufferverdünnung gelöst und wie oben vermessen. Dabei wurde alle 3 Minuten die Extinktion abgelesen. Es zeigte sich, daß über einen längeren Zeitraum keine lineare Abnahme der Extinktion erfolgt, sondern daß nach etwa 15 Minuten die Extinktion nicht mehr so schnell abnimmt (Abb.30).

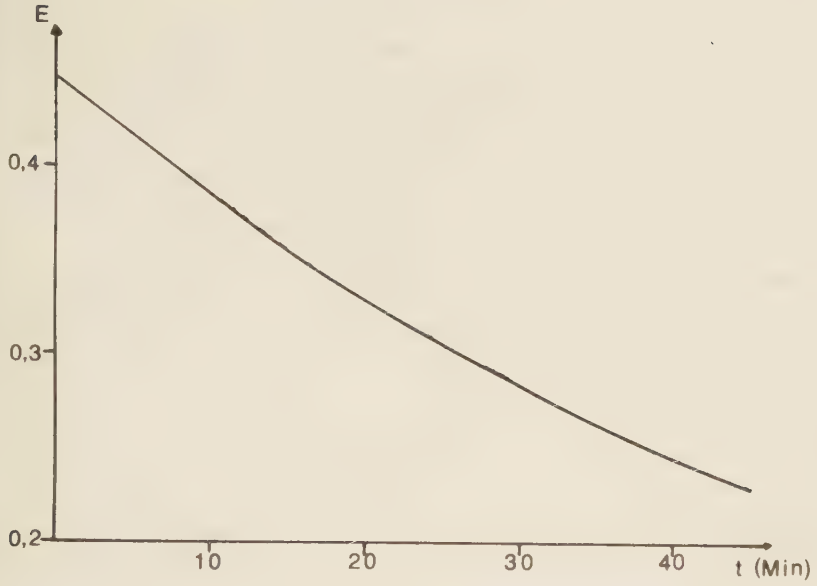


Abb.30: Extinktion-Zeit-Diagramm des Farbstoffes bei 436 nm in Pufferverdünnung, gegen reine Pufferverdünnung gemessen

5.5 Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Extinktion bei 436 nm im praxisbezogenen Ansatz

Für diese Messungen wurde das in 5.3 beschriebene Pipettierschema verwendet. Die Extinktion bei 436 nm wurde alle 3 Minuten registriert. Es wurde wieder eine nichtlineare Abnahme der Extinktion mit der Zeit festgestellt (Abb.31). Im Vergleich zum reinen Farbstoff nimmt beim praxisbezogenen Ansatz die Extinktion besonders am Anfang schneller ab. Hier scheinen also neben der Zersetzung des Farbstoffes noch andere Vorgänge eine Rolle zu spielen.

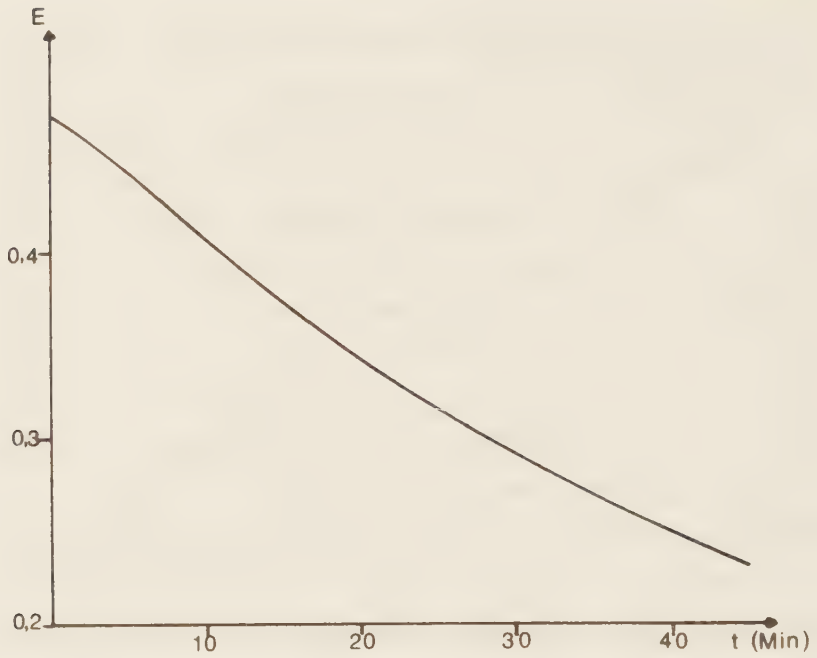


Abb.31: Extinktion des praxisbezogenen Ansatzes bei 436 nm in Abhängigkeit von der Zeit

Da in diesem Ansatz das Farbreagens DCI im Überschuß eingesetzt wurde, liegt die Vermutung nahe, dessen Zersetzung könnte auch einen Einfluß auf die Extinktion bei 436 nm haben.

Diese Vermutung konnte durch folgenden Versuch überprüft werden. Dabei wurde die Referenzlösung des praxisbezogenen Ansatzes gegen eine Mischung aus Pufferverdünnung, H_2O und absol. Ethanol vermessen. Wie erwartet stieg die Extinktion mit der Zeit kontinuierlich an.

Dieser Zersetzungsvorgang macht sich jedoch beim praxisbezogenen Ansatz nicht direkt bemerkbar, da dort sowohl Proben- als auch Referenzlösung DCI enthalten und so die zersetzungsbedingte Extinktionszunahme kompensiert wird. Unterläßt man die Zugabe von DCI in der Referenzküvette und gibt statt dessen nur Ethanol hinzu, so erhält man das folgende Extinktions-Zeit-Diagramm (Abb.32):

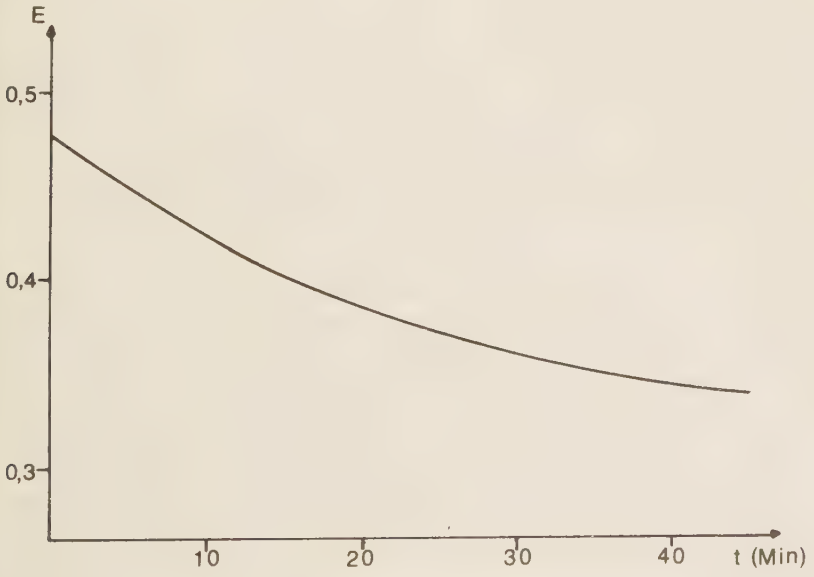


Abb.32: Extinktions-Zeit-Diagramm bei 436 nm des praxisbezogenen Ansatzes ohne DCI-Zugabe zur Referenzlösung

Vergleicht man dieses Diagramm mit dem des praxisbezogenen Ansatzes (Abb.31), so stellt man hier eine wesentliche Verlangsamung der Extinktionsabnahme fest. Diese Kurve ist die Resultierende aus zwei verschiedenen Vorgängen. Zum einen zersetzt sich der Farbstoff, dies führt zur Abnahme der durch ihn hervorgerufenen Extinktion. Auf der anderen Seite zersetzt sich das im Überschuß vorhandene DCI ebenfalls, was aber zu einer Extinktionszunahme führt, wobei DCI selbst bei 436 nm keine Extinktion aufweist (vgl. Abb.28).

Die hier beschriebenen Versuche zeigen, daß bei der Reaktion von Harnsäure mit DCI sich sowohl der entstehende Farbstoff als auch das im Überschuß eingesetzte Reagens DCI im Reaktionsmedium zersetzen. Diese Vorgänge führen zur Abnahme der Extinktion bei 436 nm. Wie der Vergleich der Extinktion-Zeit-Diagramme des isolierten Farbstoffes (Abb.30) und des praxisbezogenen Ansatzes (Abb.31) zeigt, scheinen beide Zersetzungsreaktionen nicht unabhängig voneinander abzulaufen. Um zu untersuchen, in wie weit die Menge an überschüssigem DCI sich auf die Zersetzung des Farbstoffes und die damit verbundene Extinktionsabnahme auswirkt, wurde im nächsten Versuch die eingesetzte DCI-Menge halbiert, so daß sich folgendes Pipettierschema ergab:

Probe	Referenz
0,3 ml Harnsäurelösung	0,3 ml H_2O
2,0 ml Pufferverdünnung	2,0 ml Pufferverdünnung
0,01 ml 2,6-Dichlorchinon-4-chlorimin-Lösung	

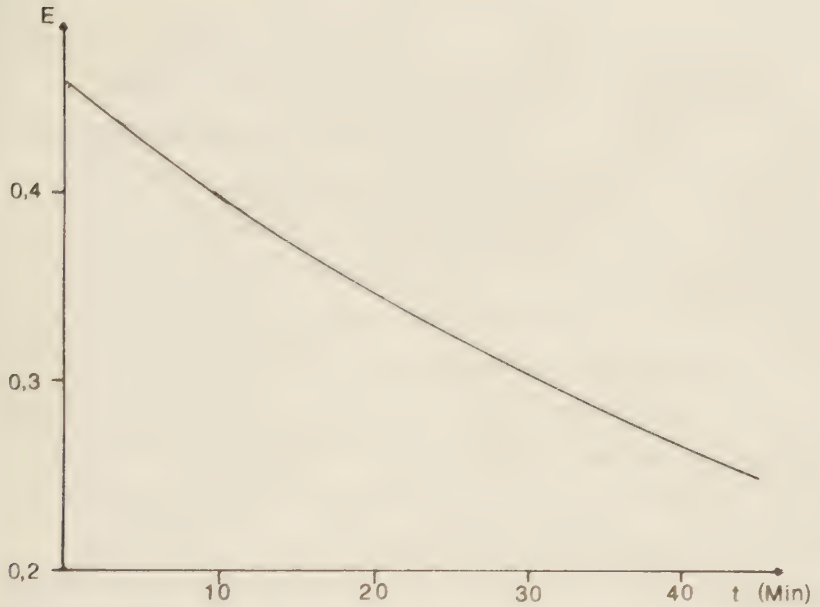


Abb.33: Extinktionsabnahme bei 436 nm des praxisbezogenen Ansatzes bei halbierter DCI-Menge

Das damit erhaltene Extinktion-Zeit-Diagramm ist in Abb.33 wiedergegeben. Ein Vergleich mit dem entsprechenden Diagramm des normalen Ansatzes (Abb.31) zeigt, daß hier die Extinktion nicht ganz so schnell abnimmt. Damit scheint sich die Vermutung zu bestätigen, daß bei abnehmendem DCI-Überschuß auch die Zersetzungsgeschwindigkeit des Farbstoffes abnimmt.

Über die Zersetzungsvorgänge bei der Bildung des Farbstoffes aus Harnsäure und DCI läßt sich also folgendes aussagen:

- der Farbstoff zersetzt sich bereits kurz nach seiner Bildung wieder
- das im Überschuß eingesetzte Reagens DCI zersetzt sich ebenfalls im Reaktionsmedium
- beide Vorgänge laufen nicht unabhängig voneinander ab.

Über die chemischen Vorgänge bei der Zersetzung des DCI in Boratpuffer gibt es verschiedene Vorstellungen. FEARON[2] vermutete, daß sich dabei 2,6-Dichlorchinon-4-oxim bildet. Die Bildung dieser Verbindung soll sich aber durch die hohe Konzentration an Chlorid-Ionen im Puffer unterdrücken lassen[2]. Durch UV-spektroskopische Untersuchungen bei Arbeiten über die Darstellung von 2,6-Dichlorindophenolaten konnten SVOBODOVA et al.[37] intermediär das Auftreten von 2,6-Dichlorchinon-4-imin nachweisen. Diese Verbindung soll die reaktive Zwischenstufe sein, die dann mit dem entsprechenden Phenol zum Indophenolat reagiert. Für die Zersetzung des DCI kann also ein ionischer Mechanismus angenommen werden. METZGER[1] konnte jedoch bei der Bildung und Zersetzung des Farbstoffes radikalische Zwischenstufen durch ESR-Messungen nachweisen. Für das DCI konnten solche Radikale nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund sollte eine Verhinderung der Farbstoffzersetzung durch den Zusatz von Radikalfängern zur Reaktionslösung möglich sein.

5.6 Versuche zur Verhinderung der Farbstoffzersetzung

Die folgenden Versuche wurde wieder am isolierten Farbstoff durchgeführt. Als Inhibitoren können bei Radikalreaktionen solche Substanzen eingesetzt werden, die mit den Radikalen der Reaktionskette neue, energieärmere Radikale bilden, die nicht mehr weiter reagieren können, wie z.B. Hydrochinon[38].

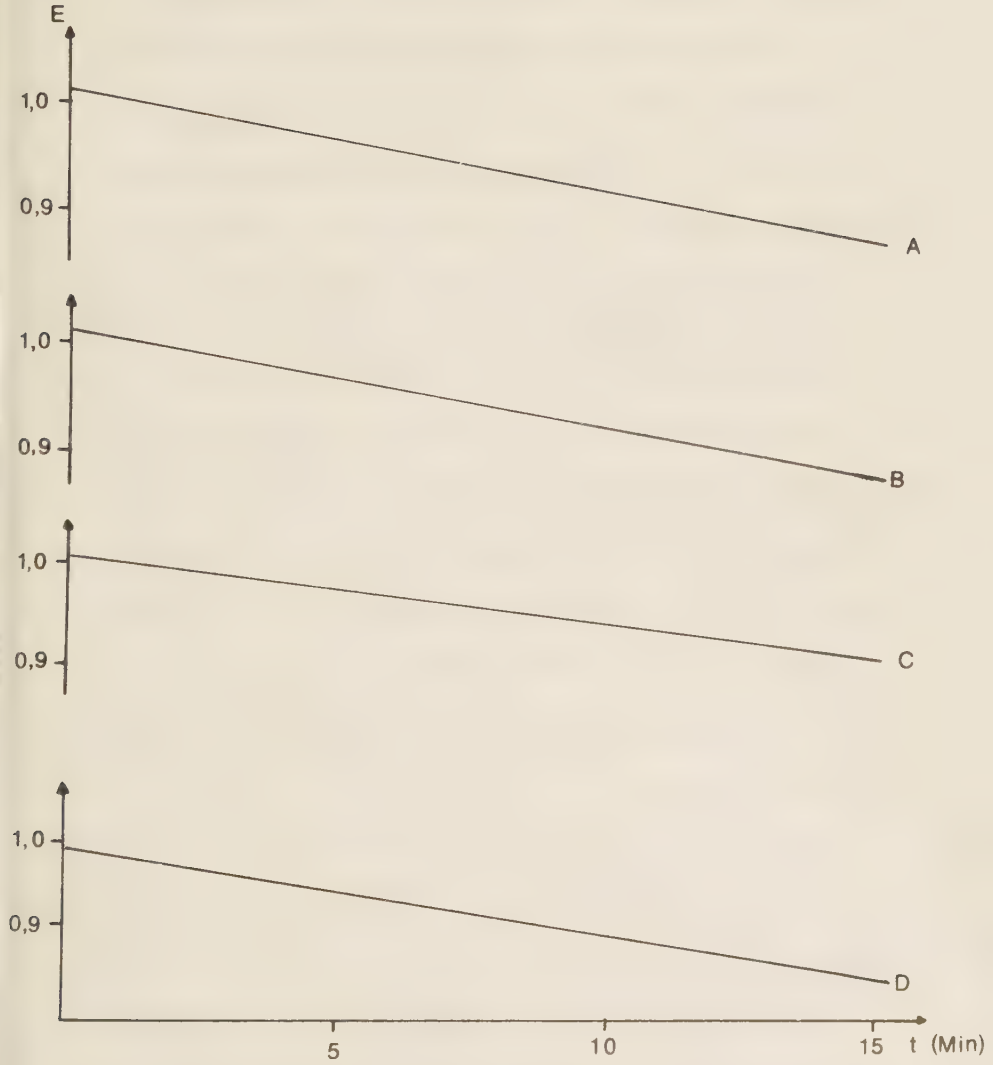


Abb.34: Extinktion-Zeit-Diagramme bei 436 nm des Farbstoffes in Pufferverdünnung unter Zusatz verschiedener Radikalfänger (A: kein Zusatz, B: + Brenzcatechin, C: + Hydrochinon, D: + Diphenylamin)

Verbindungen, die ähnlich reagieren, sind z.B. auch Brenzcatechin und Diphenylamin. Diese drei Substanzen wurden für die folgenden Experimente verwendet:
Dazu wurden jeweils 0,4 mg Farbstoff in 10 ml Pufferverdünnung gelöst, 2 ml entnommen und mit 0,01 ml einer 0,1proz. Lösung des Inhibitors versetzt. Diese Ansätze wurden gegen reine Pufferverdünnung wie beschrieben vermessen, wobei die Extinktion nach jeder Minute abgelesen wurde (Abb.34). Als Bezug wurde eine reine Farbstofflösung verwendet.

Der Zusatz von Brenzcatechin (Gerade B) veränderte die Zersetzungsgeschwindigkeit im Vergleich zum reinen Farbstoff (Gerade A) nicht. Auch Diphenylamin (Gerade D) ergab keine Verlangsamung der Farbstoffzersetzung. Nur bei Zusatz von Hydrochinon (Gerade C) wurde eine geringfügige Verzögerung der Zersetzung des Farbstoffes festgestellt.
In diesen Versuchen konnte also kein wesentlicher Einfluß der verwendeten Inhibitoren auf die Stabilität des Farbstoffes festgestellt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wird die Struktur des bei der Farbreaktion zwischen Harnsäure und 2,6-Dichlorchinon-4-chlorimin (DCI) entstehenden Farbstoffes geklärt, dessen Stabilität im Reaktionsmedium untersucht, und Versuche unternommen, seine Zersetzung zu beeinflußen.

Die von H. METZGER (1976) entwickelte Harnsäurebestimmung geht auf eine von FEARON (1944) gefundene Farbreaktion von Harnsäure mit DCI zurück. Über den Mechanismus dieser Umsetzung gibt es verschiedene Vorstellungen: Nach FEARON greift DCI am Stickstoff N-7 der Harnsäure an, während H. METZGER den Stickstoff N-9 als Angriffspunkt für DCI ansah.
Die Aufklärung des Reaktionsmechanismus wurde auf zwei Wegen erreicht:

- Vergleich der ^{13}C-chemischen Verschiebungen des Farbstoffsalzes und der Harnsäure
- Umsetzung von DCI mit Harnsäure$\left[7\text{-}^{15}N\right]$ und Analyse der Kopplungsmuster in den ^{1}H-, ^{13}C- und ^{15}N-NMR-Spektren.

Aufgrund des Verschiebungsvergleiches konnten die Stickstoffatome N-3 und N-9 der Harnsäure als Angriffspunkte des DCI ausgeschlossen werden. Die Kopplungen in den NMR-Spektren der Harnsäure$\left[7\text{-}^{15}N\right]$ und des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes ließen den Schluß zu, daß DCI den Stickstoff N-7 angreift. Diese Aussage konnte durch folgende Argumente untermauert werden:

- starke Tieffeldverschiebung des Kohlenstoffes C-5 im Farbstoffsalz gegenüber Harnsäure,

- Auftreten einer $^{4}J_{NH}$-Kopplung im ^{1}H-NMR-Spektrum des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes,
- Veränderung der ^{13}C-^{15}N-Kopplungen im ^{13}C-NMR-Spektrum des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes und
- Tieffeldverschiebung des Stickstoffes 7-^{15}N im ^{15}N-NMR-Spektrum des ^{15}N-markierten Farbstoffsalzes gegenüber Harnsäure$\left[7\text{-}^{15}N\right]$.

Mit Hilfe der UV-Spektroskopie wurde gezeigt, daß bei der Bildung des Farbstoffes zwei Zersetzungsprozesse ablaufen, die Hydrolyse von DCI und die radikalische Zersetzung des Farbstoffes. Versuche, dies zu verhindern, brachten keine positiven Resultate.

7 EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 Geräte

Schmelzpunktsbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Kofler-Schmelzpunktsmikroskop der Firma Reichelt ermittelt und unkorrigiert angegeben.

Infrarotspektroskopie

Beckman Spectrometer 4250. Die Spektrenaufnahme erfolgte in KBr-Preßlingen.

Elektronenspektroskopie

Die Messungen wurden an einem Beckman Spectrometer Modell 24 in Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) durchgeführt.

Dünnschichtchromatographie

Zur DC wurden Kieselgel 60 F_{254}-Glasplatten der Firma E. Merck, Darmstadt, mit einer Schichtdicke von 0,25 mm benützt. Die Entwicklung der Platten erfolgte unter Kammersättigung, die Detektion im UV-Licht bei 254 nm.

Kernresonanzspektroskopie

80 MHz-^{1}H-Spektren: Bruker WP 80, Meßtemperatur 28°C;
Spektrenbreite 1250 Hz
Interner Standard war TMS bzw. das Signal des jeweilig verwendeten Lösungsmittels.

20,115 MHz-^{13}C-Spektren: Bruker WP 80, Meßtemperatur 28°C; Spektrenbreite 5000 Hz
Interner Standard war das Signal des jeweiligen Lösungsmittels.

Die Steuerung des Kernresonanzspektrometers WP 80, die Spektrenakkumulation und Fourier-Transformation erfolgte mit der Computereinheit Bruker BNC 28.

9,12 MHz-^{15}N-Spektren: Bruker HFX-90 Multikernspektrometer mit Datensystem Aspect 2000, Meßtemperatur 28°C.
Externer Standard war Nitromethan, die chemischen Verschiebungen wurden auf den Standard Ammoniak umgerechnet und so angegeben.

100,57 MHz-^{13}C-Spektren: Bruker WM 400, supraleitender Magnet mit angeschlossenem Computer Aspect 2000, Meßtemperatur 28°C.
Interner Standard war das Signal des jeweiligen Lösungsmittels.

Die Aufnahme der 9,12 MHz-^{15}N-Spektren und der 100,57 MHz-^{13}C-Spektren erfolgte am Chemischen Institut der Universität Bonn. Für die Aufnahme und Diskussion der Spektren möchte ich Herrn Prof. Dr. E. Breitmaier sehr herzlich danken.

7.2 Boratpufferlösung

3,0915 g (50 mmol) H_3BO_3

3,728 g (50 mmol) KCl

50,0 g (855,6 mmol) NaCl

219,5 ml 0,1N-NaOH

ad 500,0 ml dest. H_2O

Die pH-Messung erfolgte mit dem pH-Meter E 520, Metrohm Herisau. Eventuell muß der pH-Wert mit 0,1N-NaOH auf 9,2 eingestellt werden.

Die Pufferverdünnung wurde wie folgt hergestellt:
20 ml 0,1M-Boratpuffer (pH 9,2) werden mit 80 ml dest. H_2O verdünnt.

7.3 Darstellung von 4-Amino-5-nitrosouracil $\left[{}^{15}N{=}O\right]$ nach Lit[15], modifiziert

6,35 g 4-Aminouracil (0,05 Mol) wurden in einer Mischung aus 150 ml H_2O und 30 ml Eisessig suspendiert und tropfenweise unter gutem Rühren mit einer Lösung von 5 g $Na^{15}NO_2$ in 40 ml H_2O versetzt. Nach beendeter Zugabe wurde die violette Mischung noch 30 min gerührt. Die Nitrosoverbindung wurde abfiltriert, mit Eiswasser gewaschen und feucht weiterverarbeitet. Die Ausbeute wurde deshalb nicht bestimmt.

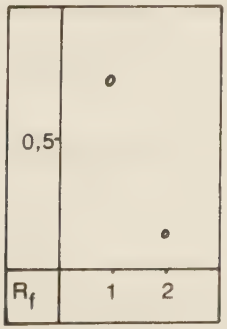


Abb.35: DC von 4-Aminouracil und 4-Amino-5-nitrosouracil $\left[{}^{15}N{=}O\right]$
Fließmittel: $CHCl_3$/Aceton/NH_3 10:10:1
1 4-Aminouracil
2 4-Amino-5-nitrosouracil $\left[{}^{15}N{=}O\right]$

IR (KBr): 1440 cm^{-1} (N=O)

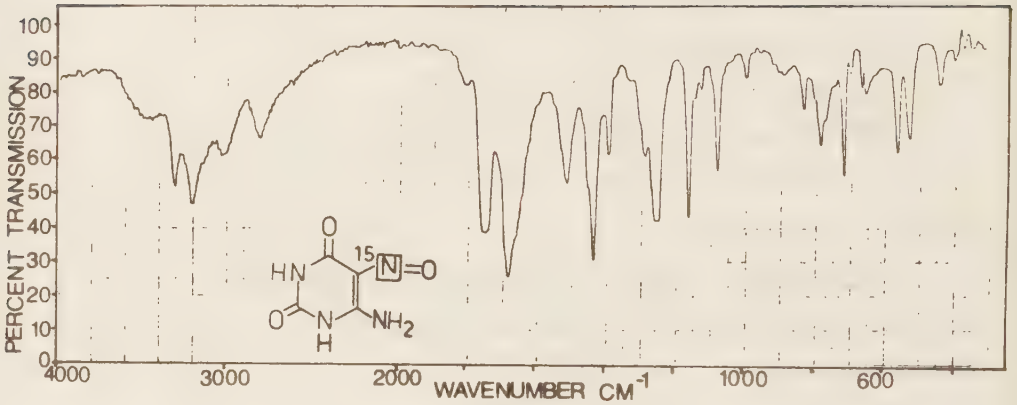


Abb.36: IR-Spektrum von 4-Amino-5-nitrosouracil [^{15}N=O]

7.4 Darstellung von 4,5-Diaminouracil [5-$^{15}NH_2$] nach Lit.[15)]

Die feuchte Nitrosoverbindung wurde in 150 ml H_2O suspendiert und auf dem Wasserbad erhitzt. Unter gutem Rühren wurde in kleinen Portionen soviel festes $Na_2S_2O_4$ zugesetzt, bis die rosarote Farbe der Nitrosoverbindung vollständig verblaßt war (DC-Kontrolle). Danach wurden noch 2 g $Na_2S_2O_4$ zur Mischung hinzugegeben und weitere 15 min. erhitzt. Der abgekühlte Ansatz wurde filtriert und mit H_2O gewaschen. Das erhaltene Bisulfitsalz wurde getrocknet, in 20 ml konz. HCl gelöst und unter Rühren 1 h auf der Wasserbad erhitzt. Das HCl-Salz wurde bei Raumtemperatur filtriert, mit Acton ausgewaschen und i.Vak. über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 6,93 g (77,6% d.Th.)

Smp.: > 300°C (Lit.[15)] 300-305°C)

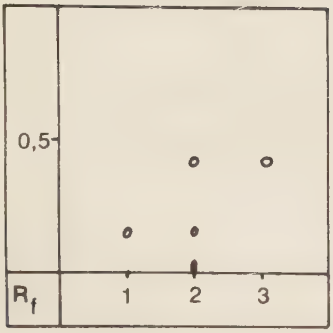


Abb.37:
DC von 4,5-Diaminouracil $\left[5\text{-}^{15}NH_2\right]$ (3)
Fließmittel siehe 7.3
1 4-Amino-5-nitrosouracil $\left[5\text{-}^{15}N{=}O\right]$
2 Reaktionsmischung

Die freie Base wurde nach PFLEIDERER[39] dargestellt:
1 g Hydrochlorid wurden in 20 ml H_2O suspendiert. Diese Mischung wurde mit verd. NH_3 bis pH 7-8 geringfügig alkalisiert. Das Amin wurde abgesaugt, mit H_2O und C_2H_5OH gewaschen und i. Vak. über Blaugel getrocknet.
Ausbeute: 600 mg (76% d. Th.)
Smp.: > 300°C
IR (KBr): 3360, 3400, 3460 cm^{-1} (arom. NH_2)

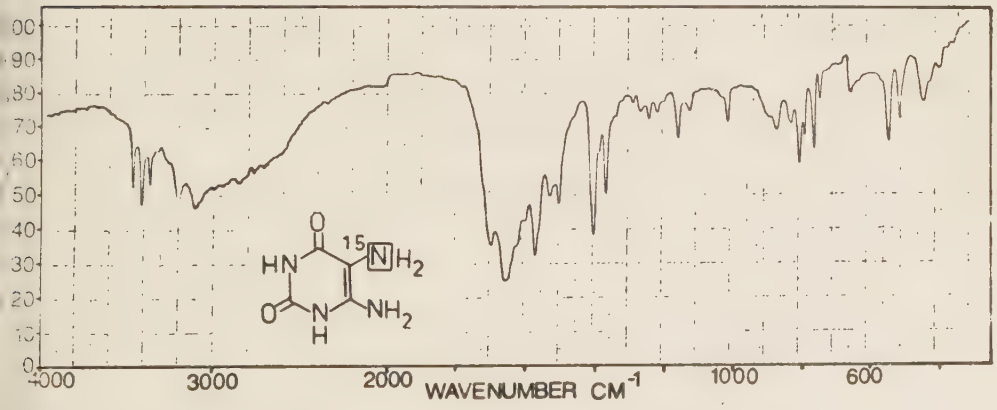


Abb.38: IR-Spektrum von 4,5-Diaminouracil $\left[5\text{-}^{15}NH_2\right]$

7.5 Darstellung von Harnsäure [7-^{15}N] in Anlehung an JOHNSON und JOHNS[13)]

6,93 g 4,5-Diaminouracil·HCl [7-$^{15}NH_2$] (0,039 Mol) wurden mit 6,93 g Harnstoff (0,16 Mol) gut vermischt und getrocknet. Die Mischung wurde in einem 250 ml-Iodzahlkolben überführt, im Ölbad langsam auf 170°C erhitzt und diese Temperatur über 1 h beibehalten. Nach dem Erkalten wurde der Schmelzkuchen mit 500 ml H_2O ausgekocht, um nicht umgesetzte Ausgangsprodukte zu entfernen. Der heiß abfiltrierte Rückstand wurde in 700 ml verd. NaOH gelöst. Diese Lösung wurde abfiltriert und das Filtrat mit 800 ml verd. HCl angesäuert. Die dabei anfallende rohe Harnsäure [7-^{15}N] wurde nochmals wie oben umgefällt und zum Schluß mit einer Mischung aus 20 ml HCl und 500 ml H_2O gekocht. Nach dem Absaugen wurde säurefrei gewaschen und i. Vak. über $CaCl_2$ getrocknet.

Ausbeute: 5,1 g (57% d. Th.)

Smp.: > 300°C

^{13}C-NMR (DMSO-d_6): δ (ppm) = 97.38 (C-5, $^1J_{CN}$ = 17,1 Hz), 136.96 (C-4, $^2J_{CN}$ = 1,8 Hz), 150,42 (C-2), 152,59 (C-8, $^1J_{CN}$ = 20,1 Hz), 153.68 (C-6, $^2J_{CN}$ = 1,8 Hz)

^{15}N-NMR (DMSO-d_6): δ (ppm, bezogen auf NH_3 = 0.0 ppm) = 68.1 (N-7, $^1J_{NH}$ = 97,0 Hz).

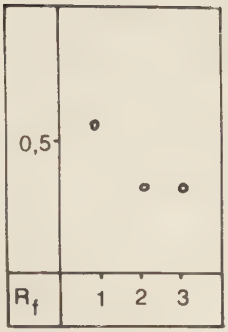


Abb.39: DC der Harnsäure [7-^{15}N]

Fließmittel: Ethylacetat/Methanol/

NH_3/H_2O 50:20:1:9

1 Diaminouracilhydrochlorid

2 Harnsäure [7-^{15}N]

3 Harnsäure "Merck"

IR (KBr): 3000 (N-H, O-H breit), 1670 (C=O, C=N), 1590 cm^{-1} (C=C)

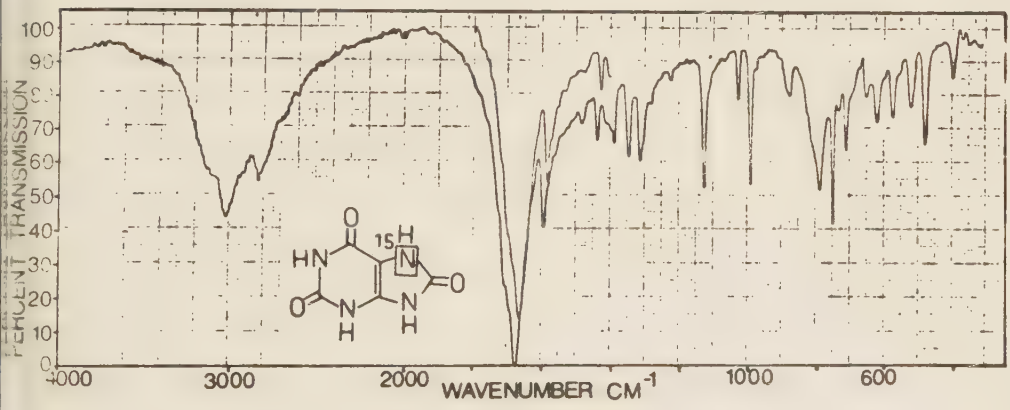


Abb.40: IR-Spektrum der Harnsäure [7-^{15}N] (KBr)

7.6 Darstellung von 4-Amino-5-ethoxycarbonylaminouracil[8)]

3,3 g 4,5-Diaminouracil·HCl (0,018 Mol) wurden in 50 ml H_2O gelöst, mit 1,95 g $ClCOOC_2H_5$ (0,018 Mol) versetzt, durch tropfenweise Zugabe von 7,5 g 5N-NaOH alkalisiert und nach beendeter Zugabe noch 1 h weitergerührt. Die alkalische Mischung wurde mit CH_3COOH angesäuert. Das ausgefallende Produkt wurde abgesaugt und aus H_2O umkristallisiert.

Ausbeute: 2,8 g (71% d.Th.)

Smp.: > 300°C

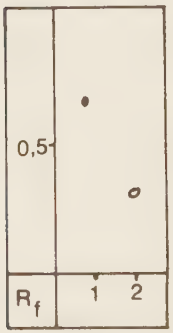


Abb.41: DC von 4-Amino-5-ethoxycarbonylaminouracil (2)
Fließmittel: $CHCl_3$/Methanol 1:1
1 4,5-Diaminouracil

7.7 Synthese der Harnsäure nach Lit.[8)]

2,8 g 4-Amino-5-ethoxycarbonylaminouracil (0,013 Mol) wurden in 50 ml 5N-NaOH 1 h unter Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wurde filtriert und das Filtrat mit 80 ml verd. HCl bis pH 1 angesäuert. Die ausfallende Harnsäure wurde nach dem in 7.5 beschriebenen Verfahren gereinigt.

Ausbeute: 400 mg (18% d.Th.)

Smp.: > 300°C

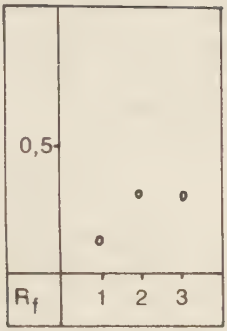


Abb.42: DC der Harnsäure

Fließmittel: siehe 7.4

1 4-Amino-5-ethoxycarbonylaminouracil

2 Harnsäure

3 Harnsäure "Merck"

7.8 Farbstoffsäure

7.8.1 Darstellung nach H. METZGER[1)]

400 mg DCI (1,9 mmol) wurden in 20 ml C_2H_5OH gelöst und auf -4°C abgekühlt. 200 mg Harnsäure (1,1 mmol) und 160 mg Li_2CO_3 (2,2 mmol) wurden in 30 ml 60°C warmen H_2O gelöst und nach dem Abkühlen auf 22°C mit 5 ml 0,1M-Boratpuffer (pH 9,2) versetzt. Die übersättigte Harnsäurelösung wurde sofort in die abgekühlte Lösung des Chinonimins gefiltert. Dabei fiel ein dunkelroter, voluminöser Niederschlag aus, der auf einer Glasfritte abgenutscht, mehrfach mit absol. C_2H_5OH gewaschen und über P_2O_5 i. Vak. getrocknet wurde.

Ausbeute: 200 mg (40% d. Th.)

Smp.: > 300°C

200 mg des getrockneten Farbstoffsalzes wurden mit 10 ml 1N-HCl 5 min geschüttelt, die gelbe Aufschlämmung über eine Glasfritte abgenutscht und solange mit H_2O gewaschen, bis im Filtrat kein Cl^- mehr nachzuweisen war. Nach dem Trocknen

über P_2O_5 i.Vak. bei 80°C löste sich die Substanz gut in Aceton, blieb nach dem Abdunsten des Lösungsmittels rot zurück und wurde beim Trocknen wieder gelb. Beim Umkristallisieren aus CH_3OH erhielt man eine hellgelbe Substanz.

Ausbeute: 140 mg (82% d.Th.)

Smp.: 270°C (Z., Aceton)

205°C (Z., CH_3OH)

7.8.2 Abgeänderte Vorschrift

Vor dem Zusammengießen wurde nicht nur die DCI-, sondern auch die Harnsäurelösung auf -4°C abgekühlt. Dann wurde weiter wie unter 7.8.1 beschrieben verfahren.

Ausbeute: 200 mg (91% d. Th.)

Smp.: 285°C (Z.)

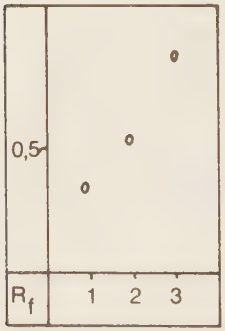


Abb.43: DC der Farbstoffsäure

Fließmittel: siehe 7.4

1 Harnsäure

2 Farbstoffsäure

3 DCI

UV (0,1M-Boratpuffer pH 9,2): λ_{max} = 436 nm

IR (KBr): 3120, 3200, 3430 (N-H, C-H, O-H),
1650 - 1810 cm^{-1} (C=O, C=N, C=C)

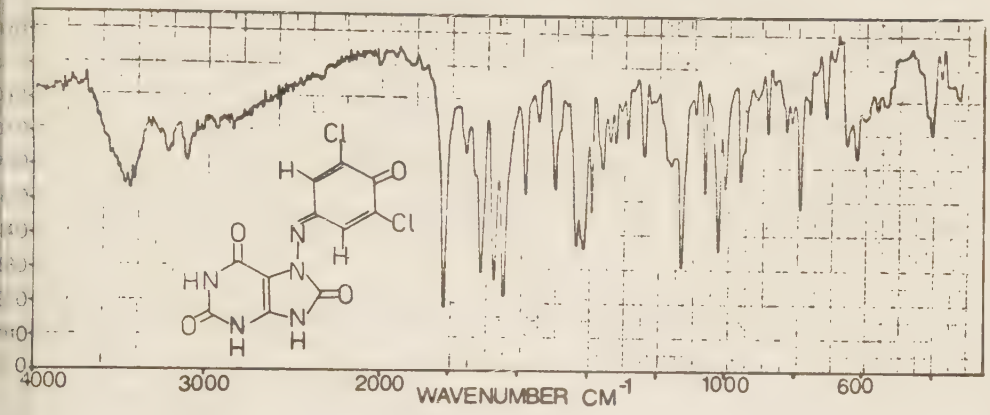


Abb.44: IR-Spektrum der Farbstoffsäure

^{1}H-NMR (Aceton-d_6): δ (ppm) = 8.14 (s)

7.9 Farbstoffsalz

400 mg DCI (1,9 mmol) wurden in 20 ml absol. C_2H_5OH gelöst und auf -4°C abgekühlt (Lösung 1). 200 mg Harnsäure (1,1 mmol) und 160 mg Li_2CO_3 (2,2 mmol) wurden in 30 ml H_2O gelöst und dann mit 5 ml 0,1M-Boratpuffer (pH 9,2) versetzt (Lösung 2). Lösung 2 wurde ebenfalls auf -4°C abgekühlt, wobei darauf zu achten ist, daß keine Harnsäure ausfällt, und sofort unter Rühren und Kühlen in Lösung 1 eingegossen. Die dunkelrote Mischung wurde mit 50 ml Diethylether ausgeschüttelt.

Unter Kühlung fiel aus der wäßrigen Phase nach 30 min das Farbstoffsalz aus, welches durch einen Büchnertrichter rasch abgesaugt, mit C_2H_5OH und Ether nachgewaschen und über Blaugel i. Vak. getrocknet wurde.

Ausbeute: 220 mg (44% d. Th.)

Smp.: > 300°C

UV (0,1M-Boratpuffer pH 9,2): λ_{max} = 436 nm

IR (KBr): 3400 (breit, O-H), 1755 (C=O), 1675, 1625, 1580 cm^{-1} (C=O, C=N, C=C)

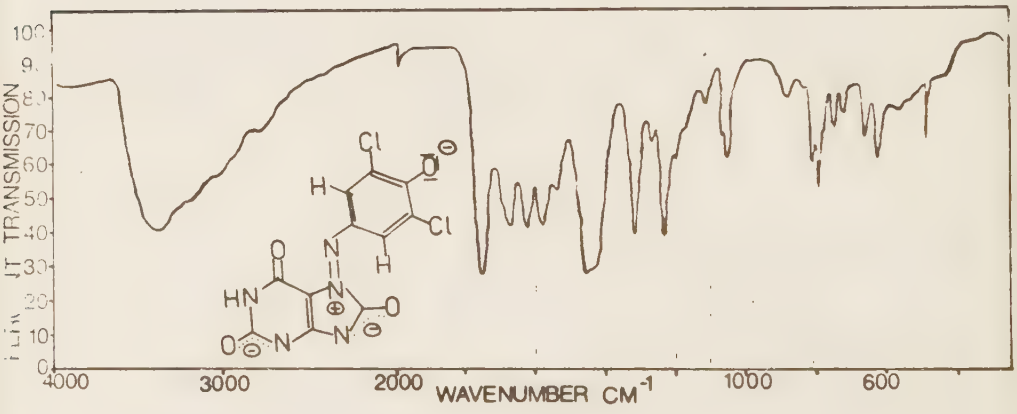


Abb.45: IR-Spektrum des Farbstoffsalzes

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ (ppm) = 7.8 (s)

^{13}C-NMR (DMSO-d_6): δ (ppm) = 122.5 (C-3', C-5'), 127.3 (C-5), 130.1 (C-2', C-6'), 149.3 (C-4), 151.1 (C-4'), 158.2 (C-6), 159.7 (C-8), 161.2 (C-2), 161.8 (C-1').

Nach derselben Vorschrift wurde das entsprechende ^{15}N-markierte Farbstoffsalz mit Harnsäure[7-^{15}N] hergestellt.

Ausbeute: 230 mg (46% d. Th.)

Smp.: > 300°C

UV (0,1M-Boratpuffer pH 9,2): λ_{max} = 436 nm

IR (KBr): 3400 (breit, O-H), 1755 (C=O), 1675, 1625, 1580 cm^{-1} (C=O, C=N, C=C).

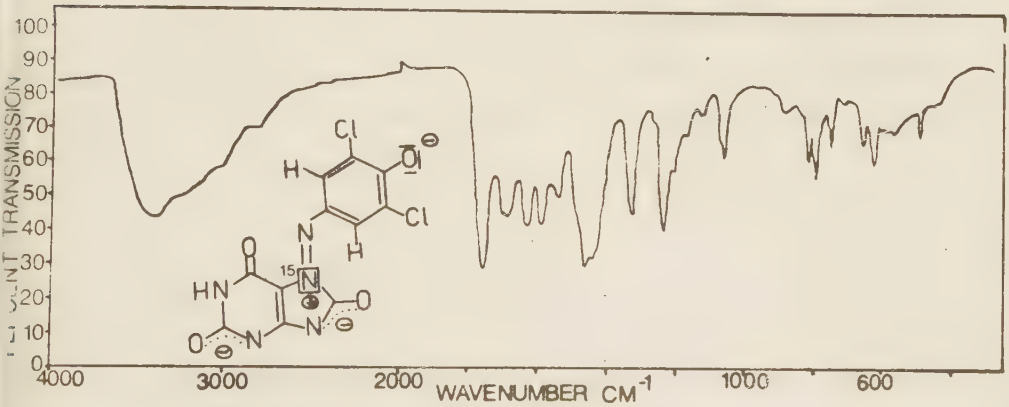


Abb.46: IR-Spektrum des 7-^{15}N-markierten Farbstoffsalzes

^1H-NMR (DMSO-d_6): δ (ppm) = 7.8 ($^4J_{NH}$ = 0,73 Hz)

^{13}C-NMR (DMSO-d_6): δ (ppm) = 122.6 (C-3', C-5'), 127.2 (C-5), 130.9 (C-2', C-6'), 148.0 (C-4), 151.2 (C-4', $^2J_{CN}$ = 2,4 Hz), 157.5 (C-6, $^2J_{CN}$ = 3,7 Hz), 159.1 (C-8, $^1J_{CN}$ = 12,2 Hz), 161,8 (C-1'), das Signal für C-2 verschwindet im Rauschen

^{15}N-NMR (DMSO-d_6): δ (ppm, bezogen auf NH_3 = 0.0 ppm) = 184.1 (s).

7.10 2,6-Dichlor-4-aminophenol[31)]

5 g 2,6-Dichlor-4-nitrophenol (0,024 Mol) wurden in 100 ml 5proz. NaOH gelöst und zum Sieden erhitzt. Der siedende Ansatz wurde solange mit festem $Na_2S_2O_4$ versetzt, bis die rote Farbe der alkalischen Lösung vollständig verblaßt war. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur kristallisierte das Aminophenol aus. Es wurde abgesaugt, mit H_2O neutral gewaschen und über P_2O_5 i. Vak. getrocknet. Nach dem Umkristallisieren aus Benzol fielen farblose Nadeln aus.

Ausbeute: 2,03 g (47,4% d. Th.)

Smp.: 164-166°C (Lit.[31)]: 166-167°C).

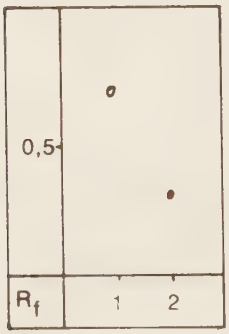


Abb.47: DC von 2,6-Dichlor-4-aminophenol (1)
2 2,6-Dichlor-4-nitrophenol
Fließmittel: $CHCl_3$/Methanol 1:1

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ (ppm) = 6.57 (s)

^{13}C-NMR (DMSO-d_6): δ (ppm) = 113.9 (C-3, C-5), 123.6 (C-2, C-6), 139.2 (C-4), 142.8 (C-1).

7.11 2,6-Dichlorchinon[30)]

10,5 g 2,6-Dichlor-4-aminophenol (0,059 Mol) wurden unter Rückfluß in einer Mischung aus 336 ml H_2O und 21,6 ml konz. H_2SO_4 gelöst. Die klare Lösung wurde auf 40°C abgekühlt und schnell unter Rühren in eine 40°C warme Lösung von 16,8 g $K_2Cr_2O_7$ (0,057 Mol) in 192 ml H_2O gegossen. Nach einigen Minuten wurde auf 10°C abgekühlt. Das ausgefallene Chinon wurde abgesaugt, mit H_2O neutral gewaschen und über Blaugel i. Vak. getrocknet. Nach dem Umkristallisieren aus C_2H_5OH erhielt man gelbe Kristalle.

Ausbeute: 5,4 g (51,4% d. Th.)

Smp.: 119°C (Lit.[30)] 120°C)

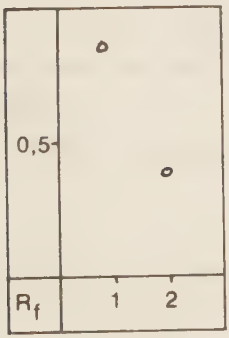


Abb.48: DC von 2,6-Dichlorchinon (1)
2 2,6-Dichlor-4-aminophenol
Fließmittel: $CHCl_3$

^{1}H-NMR (Aceton-d_6): δ (ppm) = 7.18 (s)

^{13}C-NMR (DMSO-d_6) : δ (ppm) = 133.7 (C-3, C-5), 142.8 (C-2, C-6), 172.8 (C-4), 183.4 (C-1).

7.12 2,6-Dichlorchinon-4-oxim[24)]

0,67 g 2,6-Dichlorchinon (3,8 mmol) und 0,35 g $NH_2OH \cdot HCl$ (5 mmol) wurden in 50 ml C_2H_5OH gelöst. Die klare Lösung wurde solange bei Raumtemperatur gerührt, bis dc kein Chinon mehr nachzuweisen war. Dann wurde der Ansatz auf die Hälfte eingeengt und diese Lösung in das dreifache Volumen H_2O eingerührt. Das Oxim fiel dabei als gelblich-braunes kristallines Pulver aus. Es wurde aus einer C_2H_5OH/H_2O-Mischung umkristallisiert.

Ausbeute: 310 mg (42,6% d. Th.)

Smp.: 132°C (Z., Lit.[24)]: 140°C)

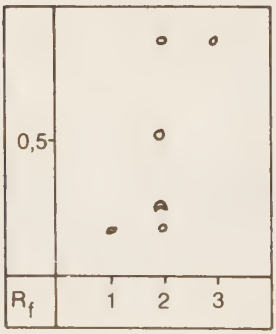


Abb.49: DC von 2,6-Dichlorchinon-4-oxim (1)
2 Reaktionsmischung
3 2,6-Dichlorchinon
Fließmittel: $CHCl_3$

^{1}H-NMR (Aceton-d_6): δ (ppm) = 8.0 (d, H_A), 7.65 (d, H_B).

7.13 2,6-Dichlorchinon-4-semicarbazon[26)]

1,76 g 2,6-Dichlorchinon (10 mmol) wurden in 50 ml C_2H_5OH gelöst, gut mit Eis gekühlt und mit einer kalten Lösung von 1,7 g Semicarbazid·HCl (15 mmol) in 6 ml H_2O versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht ins Eisfach gestellt. Der orangerote Niederschlag wurde abgesaugt, mit H_2O gewaschen und über P_2O_5 i. Vak. getrocknet. Die Reinigung der Substanz erfolgte durch Extrahieren mit 350 ml Aceton im Soxleth-Extraktor. Die gelben Kristalle wurden abgesaugt und über P_2O_5 i. Vak. getrocknet.

Ausbeute: 680 mg (29% d. Th.)

Smp.: 218°C (Z., Lit[26)]: 218°C).

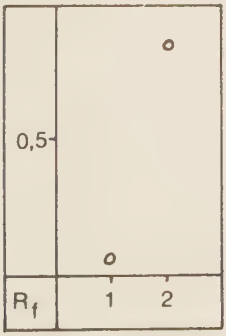


Abb.50: DC von 2,6-Dichlorchinon-4-semicarbazon (1)
2 2,6-Dichlorchinon
Fließmittel: $CHCl_3$

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.0 (s, H_A), 7.4 (s, H_B).

7.14 Extinktion-Zeit-Wertepaare zu den UV-Untersuchungen

Tab.9: Zeitabhängige Extinktion bei 436 nm des Farbstoffes mit verschiedenen Konzentrationen

t (min)	Extinktion		
	0,1 mg/10 ml	0,25 mg/10 ml	0,5 mg/10 ml
0	0,228	0,662	1,356
1	0,227	0,656	1,346
2	0,226	0,650	1,337
3	0,224	0,644	1,327
4	0,223	0,640	1,316
5	0,222	0,635	1,305
6	0,220	0,630	1,295
7	0,219	0,625	1,283
8	0,217	0,619	1,271
9	0,215	0,614	1,260
10	0,213	0,609	1,249
11	0,211	0,604	1,238
12	0,209	0,599	1,228
13	0,208	0,594	1,218
14	0,206	0,589	1,208
15	0,204	0,584	1,197

Zur Ermittlung dieser Werte wurde jeweils 2,0 ml der angegebenen Lösungen des Farbstoffes in Pufferverdünnung gegen reine Pufferverdünnung vermessen.

Tab.10: Gegenüberstellung der Extinktionsabnahme bei 436 nm des Farbstoffes und des praxisbezogenen Ansatzes

t (min)	Extinktion des	
	Farbstoffes	praxisbezogenen Ansatzes
0	0,442	0,473
3	0,428	0,456
6	0,410	0,436
9	0,391	0,413
12	0,373	0,393
15	0,356	0,373
18	0,341	0,354
21	0,326	0,337
24	0,311	0,321
27	0,298	0,305
30	0,285	0,292
33	0,273	0,279
36	0,262	0,266
39	0,251	0,254
42	0,241	0,242
45	0,231	0,231

Zur Ermittlung der Farbstoffwerte wurde 0,2 mg Farbstoff in 10 ml Pufferverdünnung gelöst, 2,0 ml dieser Lösung wurde gegen reine Pufferverdünnung vermessen.
Für den praxisbezogenen Ansatz wurde das in 5.3 angegebene Pipettierschema verwendet.

Tab.11: Die durch die Zersetzung des DCI in Pufferverdünnung hervorgerufene Extinktionszunahme bei 436 nm

t (min)	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45
Extinktion	0,005	0,011	0,016	0,023	0,032	0,041	0,050	0,060	0,070	0,080	0,090	0,100	0,110	0,120	0,130	0,140

Hier wurde der Leerwert des praxisbezogenen Ansatzes gegen reine Pufferverdünnung gemessen.

Tab.12: Extinktionsabnahme bei 436 nm und für zwei modifizierte Ansätze A1 und A2

t (min)	Extinktionen A1	Extinktionen A2
0	0,478	0,456
3	0,462	0,441
6	0,446	0,423
9	0,430	0,404
12	0,415	0,388
15	0,403	0,373
18	0,391	0,359
21	0,381	0,345
24	0,373	0,331
27	0,366	0,318
30	0,360	0,306
33	0,354	0,295
36	0,349	0,283
39	0,345	0,273
42	0,341	0,262
45	0,338	0,252

A1 Probenwert des praxisbezogenen Ansatzes gegen Pufferverdünnung ohne DCI-Zusatz gemessen

A2 Praxisbezogener Ansatz unter Verwendung der Hälfte der ursprünglichen DCI-Menge.

Tab.13: Extinktionsabnahme bei 436 nm des in Pufferverdünnung gelösten Farbstoffes unter Zusatz verschiedener Radikalfänger

t (min)	Extinktion A	B	C	D
0	1,011	1,040	1,010	0,995
1	1,002	1,031	1,001	0,986
2	0,994	1,021	0,996	0,976
3	0,986	1,012	0,990	0,970
4	0,977	1,003	0,982	0,963
5	0,969	0,994	0,976	0,952
6	0,959	0,985	0,970	0,944
7	0,950	0,976	0,963	0,935
8	0,941	0,968	0,957	0,926
9	0,932	0,960	0,950	0,919
10	0,923	0,951	0,944	0,911
11	0,914	0,942	0,939	0,903
12	0,906	0,934	0,933	0,895
13	0,897	0,926	0,927	0,887
14	0,888	0,917	0,921	0,881
15	0,880	0,909	0,915	0,872

Zur Ermittlung dieser Wertepaare wurden 0,4 mg Farbstoff in 10 ml Pufferverdünnung gelöst, 2,0 ml dieser Lösung mit 0,01 ml einer 0,1%iger Lösung des jeweiligen Inhibitors versetzt und gegen Pufferverdünnung gemessen. Dabei wurde jeweils nach einer Minute die Extinktion bei 436 nm abgelesen.

A: kein Zusatz B: + Brenzcatechin C: + Hydrochinon

D: + Diphenylamin.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1 H. Metzger, Dissertation, Tübingen 1976.

2 W. R. Fearon, Biochem. J. 38, 399 (1944).

3 H. D. Gibbs, J. Biol. Chem. 31, 1053 (1927).

4 G. Peter, Klinische Chemie, 2. Aufl., S. 403, Edition Medizin, Weinheim 1980.

5 H. Biltz und L. Hermann, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 54, 1676 (1921).

6 H. Biltz, Die neuere Harnsäurechemie, J. A. Barth Verlag, Leipzig 1936.

7 F. Bergman und S. Dikstein, J. Am. Chem. Soc. 77, 691 (1948).

8 W. Pfleiderer, Liebigs Ann. Chem. 1974, 2030.

9 H. Brandenberger, Biochim. Biophys. Acta 15, 108 (1954).

10 L. F. Cavalieri, V. E. Blair und G. B. Brown, J. Am. Chem. Soc. 70, 1240 (1948).

11 K. Clusius und M. Vecchi, Helv. Chim. Acta 36, 1324 (1953).

12 W. Traube, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 33, 1382 (1900).

13 T. B. Johnson und C. O. Johns, J. Am. Chem. Soc. 36, 545 (1914).

14 W. Traube, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 33, 3051 (1900).

15 Org. Synth., Coll. Vol. 4, 247, John Wiley Inc. New York, London 1963.

16 M. Hesse, H. Meier und B. Zeeh, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, S. 102, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1979.

17 G. C. Levy und R. L. Lichter, Nitrogen-15-Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopy, S. 120, John Wiley Inc., New York 1979.

18 Lit.[17] S. 125.

19 Lit.[17] S. 65.

20 Lit.[17] S. 109.

21 M. W. Witanowski, L. Stefaniak und G. A. Webb, ^{15}N-NMR-Spektroskopy in Annual Reports of NMR-Spektroskopy 11B, S. 404, Academic Press, London 1981.

22 Lit.[17] S. 117 und dort zitierte Literatur:

a) R. L. Richter und J. D. Roberts, J. Am. Chem. Soc. 93, 5218 (1971).

b) J. P. Jacobson, K. Schaumburg und J. Nielsen, J. Mag. Reson. 13, 372 (1974).

c) L. Ernst, E. Lustig und V. Wray, J. Magn. Reson. 22, 459 (1976).

d) R. Wasylishen und T. Shaefer, Can. J. Chem. 49, 3627 (1971).

23 G. Martin, M. Martin und J.-P. Gouesnard, ^{15}N-NMR-Spektroskopy, S. 214, S. 227 und S. 252, Springer Verlag, Berlin 1981.

24 F. Kehrmann, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 21, 3318 (1888).

25 R. K. Norris und S. Sternhell, Austr. J. Chem. 22, 935 (1969).

26 J. M. Heilbron und J. A. R. Henderson, J. Chem. Soc. 103, 1417 (1913).

27 R. J. Pugmire, D. N. Grant, J. Am. Chem. Soc. 93, 1880 (1971).

28 M.-T. Chenon, R. J. Pugmire, D. M. Grant, R. P. Panzica und L. B. Townsend, J. Am. Chem. Soc. 97, 4636 (1975).

29 L. G. Purnell und D. J. Hodgson, Org. Magn. Reson. 10, 1 (1977).

30 B. Eistert, J. Riedinger, G. Küffner und W. Lazik, Chem. Ber. 106, 727 (1973).

31 R. Adams und H. Looker, J. Am. Chem. Soc. 73, 1145 (1951).

32 E. Breitmaier und G. Bauer, ^{13}C-NMR-Spektroskopie, S. 61 Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1977.

33 Lit.[32] S. 44.

34 Lit.[32] S. 348.

35 E. Breitmaier, Pharm. Uns. Zeit 12, 161 (1983).

36 Lit.[17] S. 29.

37 D. Svobodova, P. Krenec, M. Fraenkl und J. Gasparic, Mikrochim. Acta (Wien) 1977 I, 251.

38 H. R. Christen, Grundlagen der organischen Chemie, 3. Aufl. S. 700, Verlag Sauerländer, Aarau, Diesterweg-Salle, Frankfurt am Main 1975.

39 W. Pfleiderer, Chem. Ber. 90, 2272 (1957).

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Professor Dr. K.-A. Kovar waren die Professoren und Dozenten:

H. Auterhoff, H.J. Roth, J. Schultz (Pharmazeutische Chemie)

E. Graf, H. Hamacher (Pharmazeutische Technologie)

H.P.T. Ammon (Pharmakologie)

E. Reinhard (Pharmazeutische Biologie)

K. Botzenhart (Hygiene)

M. Baumann, F. Gönnenwein (Physik)

E. Bayer, E. Breitmaier, G. Gauglitz, G. Häfelinger, M. Hanack, V. Hoffmann, S. Kemmler-Sack, D. Krug, U. Kunze, E. Lindner, J.-P. Lorenz, H. Mauser, E. Müller, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, W. Rüdorff, F. Seelig, J. Strähle, H. Straub, H. Suhr, W. Zeil (Chemie).

Lebenslauf

Name:	Michael Teutsch
Geburtstag:	19. August 1953
Geburtsort:	Baden-Baden
Eltern:	Viktor Teutsch, Apotheker und Hanna Teutsch, geb. Reiter, Apotheker- assistentin

Schulischer Werdegang

Grundschule:	Grundschule Vaihingen/Enz 1960 bis 1963 Grundschule Wildbad 1963 bis 1964
Gymnasium:	Progymnasium Wildbad 1964 bis 1966 Friedrich Abel-Gymnasium Vaihingen/Enz 1966 bis 1968 Evang.-theol. Seminar Maulbronn 1968 bis 1970 Evang.-theol. Seminar Blaubeuren 1970 bis 1972
Abitur:	23. Juni 1972

Beruflicher Werdegang

Studium der Chemie:	Universität Tübingen Oktober 1972 bis März 1978
Vordiplom Chemie:	14. April 1976

Studium der Pharmazie:	Universität Tübingen
	April 1978 bis Mai 1980
Praktische Ausbildung:	Untere Apotheke Vaihingen/Enz
	Juni 1980 bis November 1980
	Pharmazeutisches Institut der
	Universität Tübingen
	Dezember 1980 bis Mai 1981
Pharmazeutische Prüfung:	
1. Abschnitt:	16. März 1979
2. Abschnitt:	16. Mai 1980
3. Abschnitt:	22. Juni 1981
Approbation als Apotheker:	17. Juli 1981
Beginn und Abschluß der	
vorliegenden Arbeit:	Dezember 1980 bis April 1984
Wiss. Hilfskraft:	Dezember 1980 bis September 1982
Wiss. Angestellter:	Oktober 1982 bis März 1984